

Struktur-funksjonsforhold mellom bakteriofagen CTXφ og *Vibrio cholerae* type IV pili

Hanh Hieu Thi Phan



Masteroppgave i farmasi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

September 2012

Struktur-funksjonsforhold mellom
bakteriofagen CTX ϕ og
Vibrio cholerae type IV pili

Hanh Hieu Thi Phan

Masteroppgaven ble utført ved
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Farmasøytisk institutt og
Institutt for molekylær biovitenskap ved
Universitetet i Oslo i perioden august 2011 til september 2012

Veiledere:

Førsteamanuensis Hanne C. Winther-Larsen, Farmasøytisk institutt
Professor Norbert Roos, Institutt for molekylær biovitenskap,

Forord

Først vil jeg rette en stor takk til Hanne C. Winther-Larsen og Norbert Roos for svært god og engasjerende veiledning under labarbeidet. Dere har alltid hatt tid til meg når jeg har lurt på noe. En ekstra takk til Hanne for raske tilbakemeldinger mot slutten av skriveprosessen.

Videre vil jeg takke Tove Bakar på EM-laben og alle på zeb som har svart på alle mine store og små spørsmål under labarbeidet. Ellers vil jeg takke alle ved avdelingen som har bidratt til et hyggelig og lærerikt år.

Til slutt vil jeg takke familien min for all støtte under studietiden, og kjæresten min for støtte og oppmuntring gjennom arbeidet med oppgaven og for gjennomlesing av oppgaven.

Oslo, september 2012

Hanh T. Hieu Phan

Sammendrag

Vibrio cholerae er en Gram-negativ stavformet bakterie som forårsaker sykdommen kolera, en sykdom som kan gi diaré, oppkast og i de verste tilfellene død grunnet dehydrering.

Bakterien kan deles opp i flere serogrupper, hvor serogruppe O1 er en av serogruppene som kan gi store utbrudd og epidemier. Serogruppe O1 kan igjen deles opp i to biotyper: El Tor og klassisk.

V. cholerae uttrykker type IVb pili som kalles for toxin co-regulated pilus (TCP) og består av pilin-subenheter kalt TcpA. TCP er stavformede strukturer som er viktig for kolonisering av tarmen og dermed bakteriens virulensegenskaper. TCP fungerer også som en reseptor for bakteriofagen CTXφ som overfører genet for koleratoksinet (CT) til bakterien.

Bakteriofagers molekylære interaksjoner med bakterier er godt kjent, men man vet lite om hvordan CTXφ faktisk binder seg til *V. cholerae*. *V. cholerae*s interaksjon med CTXφ sammenlignes med fd-fagens binding til F-pili hos *E. coli* fordi det er vist at *V. cholerae* krever de samme komponentene hos både fag og bakterie som *E. coli*, for å kunne gjennomføre en vellykket transfeksjon. I denne oppgaven ble det benyttet transfeksjonsforsøk og bildeanalyse ved hjelp av immunogull transmisjonselektronmikroskopering for å undersøke bakterie-fag-interaksjonene nærmere. Ettersom det ikke finnes gode antistoff mot pVIII hos CTXφ ble hybridfagen fd-Δ benyttet. fd-Δ består av pIII TCP-bindingsproteiner fra CTXφ og pVIII kappeproteinet fra fd-fagen. Gode antistoff mot fd pVIII er tilgjengelig på markedet.

For å identifisere hvilke aminosyrer som er viktig for binding, ble det i oppgaven benyttet ulike *tcpA*-mutanter av villtype *V. cholerae* O395. Noen av disse forårsaker en alternativ TCP-morfologi som kan gi en bedre resolusjon i bindingsstudiene. Gjennom oppgaven ble det demonstrert at fd-Δ kan benyttes som modell i bakterie-fag-interaksjonsstudier med *V. cholerae*.

Forkortelser

aa	aminosyrer
amp	ampicillin
ATP	adenosine triphosphate
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CT	koleratoksin
dH ₂ O	destillert vann
EM	elektronmikroskopi
et al.	med fler
fag	bakteriofag
fd-Δ	fdΔ1_pIII ^{CTX} (15-274)
FSG	fish skin gelatin
ID	ikke detektbar
Ig	immunoglobulin
IPTG	isopropylthio-β-galactoside
kan	kanamycin
LA	Luria Agar
LB	Luria Bertani
M9	minimal medie
MQ	milli-Q
MWM	Molecule weight marker (molekylvektstandard)
OD	optical density
PBS	phosphate buffered saline
pH	pondus Hydrogenii
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	scanningelektronmikroskopi
strp	streptomycin
TCP	toxin co-regulated pilus
TEM	transmisjonselektronmikroskopi
tet	tetrasyklin
WBB	Western blottebuffer

Benevninger

Δ	delesjon, delta
g	gram
kb	kilobase
M	molar
mA	miliampere
min	minutt
ml	milliliter
nm	nanometer
$^{\circ}\text{C}$	grader Celsius
rpm	revolution per minute (omdreininger per minutt)
t	time
v	volt
α	alfa
β	beta
π	pi
ϕ	phi
μg	mikrogram
μl	mikroliter

1 INNLEDNING.....	1
1.1 <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	1
1.1.2 <i>Generelle egenskaper</i>	1
1.2 Pili.....	2
1.2.1 <i>Type IV pili (T4P)</i>	3
1.2.2 <i>TCP og V. cholerae</i>	4
1.3 BAKTERIOFAGER	7
1.3.1 <i>Generelle egenskaper</i>	7
1.3.2 <i>CTXϕ</i>	8
1.3.3 <i>fd-fagen</i>	9
1.3.4 <i>fdΔ1_pIII^{CTX}(15-274)</i>	12
1.4 OPPGAVENS MÅL	13
2 MATERIALER.....	14
2.1 BAKTERIESTAMMER.....	14
2.2 ANTIBIOTIKA	16
2.3 KJEMIKALIER	17
2.4 LABORATORIEUTSTYR.....	19
2.5 DIVERSE UTSTYR	20
2.6 MEDIER OG LØSNINGER	21
<i>Luria Bertani (LB), pH 6.5, 1 L</i>	21
<i>Luria Agar (LA), 1 L</i>	21
<i>M9 stock-løsning, 1 L</i>	21
<i>M9-vekstmedie, 100 ml</i>	21
<i>M9-agar base, 100 ml</i>	21
<i>PBS (phosphate buffered saline), 1L</i>	22
<i>IPTG (isopropylthio-β-galactoside)100 mM stockløsning</i>	22
<i>Fish skin gelatine (FSH)</i>	22
<i>Protein Sample buffer, 10 ml</i>	22
<i>Blottebuffer</i>	23
<i>Buph™ Tris-HEPES-SDS Running Buffer</i>	23
<i>Western Blokkebuffer (WBB), 1 liter</i>	23
<i>Western fremkallingsbuffer</i>	23
<i>Western fremkallingsvæske</i>	24
3 METODER.....	25

3.1 LAGRING OG KULTIVERING	25
3.1.1 Langtidslagring av <i>V. cholerae</i> og <i>E. coli</i>	25
3.1.2 Kultivering av bakteriene	25
3.2 FAGSUSPENSJON	27
3.3 TRANSFEKSJONSFORSK	27
3.4 GELELEKTROFORESE	29
3.4.1 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)	29
3.4.2 Immunoblott (Western blott)	31
3.4.3 Coomassie	32
3.5 ELEKTRONMIKROSKOPI (EM)	32
3.5.1 Negativ farging av bakterier og bakteriofager for TEM	33
3.5.2 Immunogull-merking av fag	33
3.5.3 Visualisering av bakterie-fag-interaksjoner	36
3.5.4 Måling av fagenes lengde	37
3.6 STATISTISKE ANALYSER	38
4 RESULTATER	39
4.1 EKSPRESJON AV TCP-PILI I <i>VIBRIO CHOLERA</i> E	39
4.1.1 Etablering av TCP-induserende vekstforhold	39
4.1.2 Verifisering av TCP-uttrykk i <i>V. cholerae</i> og <i>V. cholerae</i> mutanter med TEM	41
4.1.3 Fagisolering, TEM og lengdemåling på CTX ϕ , fd-dog og fd- Δ	43
4.2 TRANSFEKSJON AV <i>V. CHOLERA</i> E OG <i>V. CHOLERA</i> E-MUTANTER MED CTX ϕ , FD-DOG OG FD- Δ	44
4.2.1 Etablering og verifisering av transfeksjonsforsøk	44
4.2.2 fd- Δ transfeksjon av <i>V. cholerae</i> tcpA-mutanter	44
4.2.3 Transfeksjon i <i>V. cholerae</i> C6706 og C6706luxO	46
4.2.4 Uttrykk av TcpA i <i>V. cholerae</i> tcpA-mutanter som uttrykker ToxT-regulatoren fra en IPTG-induserbar promotor	46
4.2.5 <i>V. cholerae</i> og TolA-C	49
4.3 INTERAKSJONER MELLOM FD-FAG OG <i>V. CHOLERA</i> E	50
4.3.1 Immunogull TEM av fd-fag i <i>V. cholerae</i> TolA	50
5 DISKUSJON	53
5.1 ETABLERING AV PILI-INDUSERENDE FORHOLD	53
5.2 FD- Δ SOM CTX ϕ -TCP STRUKTUR-FUNKSJONSMODEL	54
5.2.1 Overuttrykk av ToxT med implikasjoner for transfeksjon hos <i>V. cholerae</i> -mutanter	58
5.2.2 <i>V. cholerae</i> O395 og interaksjoner med TolA-C	60

5.2.3 Visualisering av bakterie-fag-interaksjonene	61
5.2.4 Lengden til fagene	62
6 FORSLAG TIL VIDERE ARBEID	63
7 REFERANSER.....	64
8 VEDLEGG	67

1 Innledning

1.1 *Vibrio cholerae*

1.1.2 Generelle egenskaper

Vibrio cholerae er en Gram-negativ, stavformet bakterie som forårsaker sykdommen kolera. Sykdommen er i 75% av tilfellene asymptomatisk, men kan i andre tilfeller gi kraftig diaré og oppkast. I de verste tilfellene kan det resultere i død i løpet av få timer grunnet dehydrering hvis det forløper seg uten behandling. Sykdommen er et problem først og fremst i utviklingsland der tilgang på rent vann og god hygiene er vanskelig å opprettholde (WorldHealthOrganization). Ofte skyldes det kontaminasjon av vann som benyttes til drikking og matlaging (Ottemann and Mekalanos, 1994)

V. cholerae deles opp i flere serogrupper. De to serogruppene som forårsaker store utbrudd og epidemier er O1 og O139. Serogruppe O1 igjen kan deles opp i to biotyper, El Tor og klassisk (Calia et al., 1994). Andre serogrupper kan gi mild diaré, men gir ikke epidemier. Det er også nylig blitt oppdaget nye grupper som også indikerer på at de kan gi et mer alvorlig sykdomsbilde (WorldHealthOrganization).

Som profylakse mot kolera finnes det en drikkevaksine som består av inaktiverede bakterier og en subenhet av toksinet fra bakterien (Legemiddelhåndboka). Behandling ved smitte og kraftige symptomer er væskebehandling og eventuelt antibiotikabehandling som kan forkorte sykdomsforløpet og forhindre smitte av andre (Legemiddelhåndboka).

Bakterien har to hovedreservoarer: human gastrointestinaltrakt og vannreservoarer. Disse to miljøene skiller seg i både temperatur, osmolaritet og tilgang på næring. For å kunne overleve er bakterien avhengig av å kunne omstille seg alt etter hvilket miljø den er i (Ottemann and Mekalanos, 1994).

Bakterien har flere egenskaper den kan benytte for å overleve og gi infeksjon i gastrointestinaltrakt. Blant disse en polar flagell til kjemotaksis og for å penetrere mukosa, pili, enterotoksin og jern-regulerende proteiner for å kunne overleve i miljøer med begrenset tilgang på jern (Kaufman and Taylor, 1994).

Overlevelsen i vannreservoarer er uklar, men det er foreslått at bakteriene kan interagere med planter eller dyr, og/eller andre komponenter i miljøet. Studier viser at *V. cholerae* O1 kan assosiere med ulike plankton og alger. Antakelig sørger verten for næringsstoffer, samtidig som det forlenger bakterienes levetid, men forfatterne beskriver ikke om dette gjelder for alle serogruppene (Faruque et al., 1998).

1.2 Pili

Pili er filamentøse strukturer som befinner seg på overflaten av både Gram-negative og Gram-positive bakterier, og består av polymeriserte subenheter som kalles for pilin (Wilson et al., 2011). De kan fungere blant annet som reseptorer for ulike virus, feste seg til overflater og bidra til genoverføring (Madigan et al., 2009). De forekommer som enkle pilus eller i bunter, og kan deles i flere grupper (tabell 1).

Pili skaper kontakt mellom bakterieoverflaten og vertscellens overflate. For enkelte pili-typer finnes det et adhesin som kan gjenkjenne reseptorer (glykoproteiner eller glykolipider) på vertscellen (Wilson et al., 2011).

Tabell 1 De ulike typer pili som finnes hos Gram-negative bakterier.

Pili	Struktur/form
Type I ^a	Rigide, stavformede strukturer som kan indusere hemagglutinerings
Type II ^a	Rigide, stavformede strukturer, men induserer ikke hemagglutinerings
Type III ^a	Stavformede strukturer som er mindre rigide
Type IV ^a	Mindre rigide stavformede strukturer som ofte opptrer som bunter ved endene til stavformede Gram-negative bakterier
Type V ^a	Ligner type I, men med mindre diameter
Curli pili ^a	Lange, bølgede strukturer
Type P ^b	Adhesive organeller
a (Wilson et al., 2011), b (Proft and Baker, 2009)	

1.2.1 Type IV pili (T4P)

Type IV-pili er den eneste typen pili som til nå er identifisert hos Gram-negative og Gram-positive bakterier. T4P er en viktig koloniseringsfaktor og kan fungere i overflateadhesjoner (Pelicic, 2008). Bakteriene kan på den måten interagere med hverandre under celleaggregering eller når de danner biofilm og andre mikrokolonidannelser (Wilson et al., 2011). T4P spiller i tillegg en rolle i celledisagregasjon, transformasjon og fagbinding. For noen bakterier kan fravær av pili gi reduserte virulensegenskaper (Craig et al., 2004).

T4P har flere proteiner/enzymer som bidrar til deres egenskaper. De har en peptidase som kløyver av N-terminale leder-peptider, ATPaser som bidrar til polymerisering av pilus og noen pilus-systemer har også en depolymeriserings-ATPase (Craig and Li, 2008). T4P kan bidra til cellens bevegelse ved at pili polymeriseres og depolymeriseres ved såkalt twitching motility. Dette gjør at cellen kan dras bortover på en overflate (Madigan et al., 2009).

T4P er kun 5-8 nm i diameter, men kan bli opptil flere μm lange (Pelicic, 2008). Hver enkel-pilus består av pili-subenheter, kalt pilin. Pilin gjenkjennes ved at den blant annet består av en N-metyllert N-terminal, en hydrofob N-terminal, og en disulfidbinding i carboxy-terminalen (Craig et al., 2004).

T4P kan deles i to undergrupper, IVa og IVb, på bakgrunn av aminosyrelengden. IVa har kortere leder-peptider enn IVb, med færre enn 10 aminosyrer (aa) mot 15-30 aa hos IVb. Lengden til IVa er typisk 150-160 aa, mens IVb består enten av flere (180-200 aa) eller færre aa (40-50 aa) (Craig et al., 2004; Pelicic, 2008) (tabell 2). Den N-metyllerte N-terminal residue er fenyalanine for IVa, men varierer for IVb (Craig et al., 2004).

Tabell 2 Oversikt over hvilke bakterier man finner type IVa og type IVb pili og forskjellene mellom dem (Craig et al., 2004)

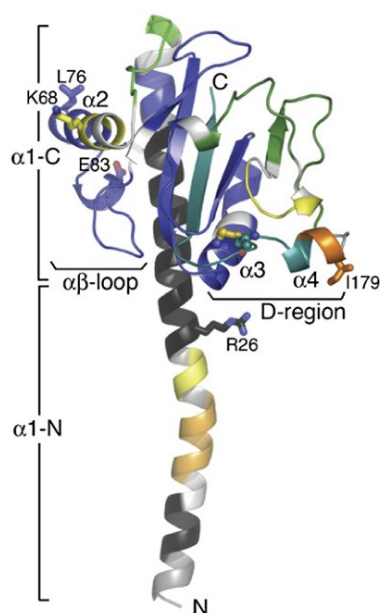
Table 2 Comparison of type IVa and type IVb pilins		
Characteristic	Type IVa pilins	Type IVb pilins
Bacterium	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PilE (GC pilin); <i>Neisseria meningitidis</i> PilE (MC pilin); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PilA (PAK pilin, K122-4 pilin); <i>Mycobacterium bovis</i> pilin; <i>Eikenella corrodens</i> EcpA; <i>Dichelobacter nodosus</i> FimA; <i>Moraxella nonliquefaciens</i> TtpA; <i>Moraxella lacunata</i> fibril protein Q; <i>Myxococcus xanthus</i> PilA; <i>Azoarcus</i> sp.	<i>Vibrio cholerae</i> TcpA; Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> BfpA; Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> LngA, CFA/III; <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi PilS; <i>Citrobacter rodentium</i> CtcA
Length of leader peptide	5–6 amino acids	15–30 amino acids
Average length of mature protein	150 amino acids	190 amino acids
N-methylated N-terminal residue	Phenylalanine	Methionine, leucine or valine
Average length of D-region	22 amino acids	55 amino acids

Pili er en viktig virulensfaktor særlig for infeksjoner i urinveiene, genital- og gastrointestinaltraktus (Proft and Baker, 2009). Type IVb pili er vist å uttrykkes hovedsakelig på bakterier som koloniserer i tarmen til mennesker. Dette omfatter *E. coli*, *Salmonella enterica* og *Vibrio cholerae* (Craig et al., 2004; Proft and Baker, 2009).

På slutten av 1940-årene ble det oppdaget at pili på Gram-negative-bakterier kunne fungere som reseptorer for bakteriofager (Proft and Baker, 2009).

1.2.2 TCP og *V. cholerae*

Vibrio cholerae har en type IVb pili som kalles for toxin co-regulated pilus (TCP), og pilin subenhetene kalles for TcpA (Li et al., 2008). TCP består av polymerer av TcpA som danner lange fibre og som kan samles til bunter (Kirn et al., 2000). Flere T4P har retraksjonsevne, men dette er ikke vist hos TCP. Likevel kan rollen TCP innehar i faginteraksjoner tyde på at det kan trekkes tilbake (Ford et al., 2012).



Figur 1 Krystallstruktur av TcpA (Li et al., 2008). T4P-subenhetene består av lik grunnstruktur, med N-metylt N-terminal, en hydrofob N-terminal og disulfidbinding i carboxy-terminalen. α -1 er en α -heliks, som er en viktig del av proteinet som bidrar til pilus-sammensetningen. α -1-N er hydrofob, mens α -1-C er amfipatisk. Den hydrofile delen eksponeres på overflaten, mens resten av strukturen utgjør kjernen (Craig et al., 2004).

Krystallstrukturen for TcpA er kjent og viser at TcpA er bygget opp av α -helikser og β -plater som sammen utgjør en komplisert struktur (figur 1). $\alpha\beta$ -loopen danner en α -heliks som ligger loddrett i forhold til resten av strukturen. Dette kan indikere på at de interagerer med nærliggende subenheter. Nesten halvparten av "globular head" består av D-regionen (figur 1), en viktig del av pilusoverflaten. Det består av epitoper og residues som er involvert i pilus-interaksjoner (Craig et al., 2004).

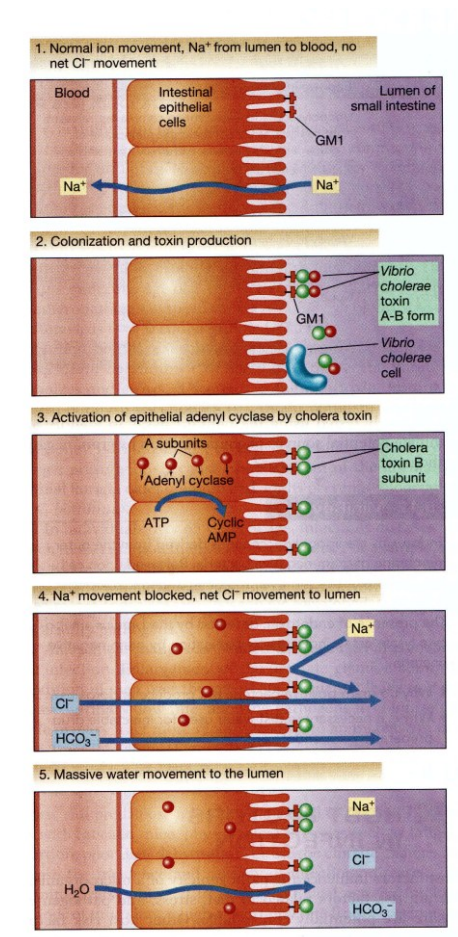
TCP kan selvaggregere for å samle bakteriene og på den måten kan de både være mer beskyttet mot vertens forsvar og konsentrere sekret toksin (Li et al., 2008). TCP er en viktig koloniseringsfaktor i human tarm og uttrykkes kun hos stammer av *V. cholerae* som kan gi epidemier som O1 og O139 (Kirn et al., 2000).

Delesjon av genet *tcpA* hos *V. cholerae* O139 har vist å gi nedsatt evne til å både kolonisere i tarm og aktivering av immunresponser. Antakelig som følge av dette ble det også vist fravær av diaré (Tacket et al., 1998), noe som er hovedsymptomet på sykdommen bakterien gir. Sammen med koleratoksinet (CT) er TCP to av de viktigste virulensfaktorene hos *V. cholerae* (Waldor and Mekalanos, 1996).

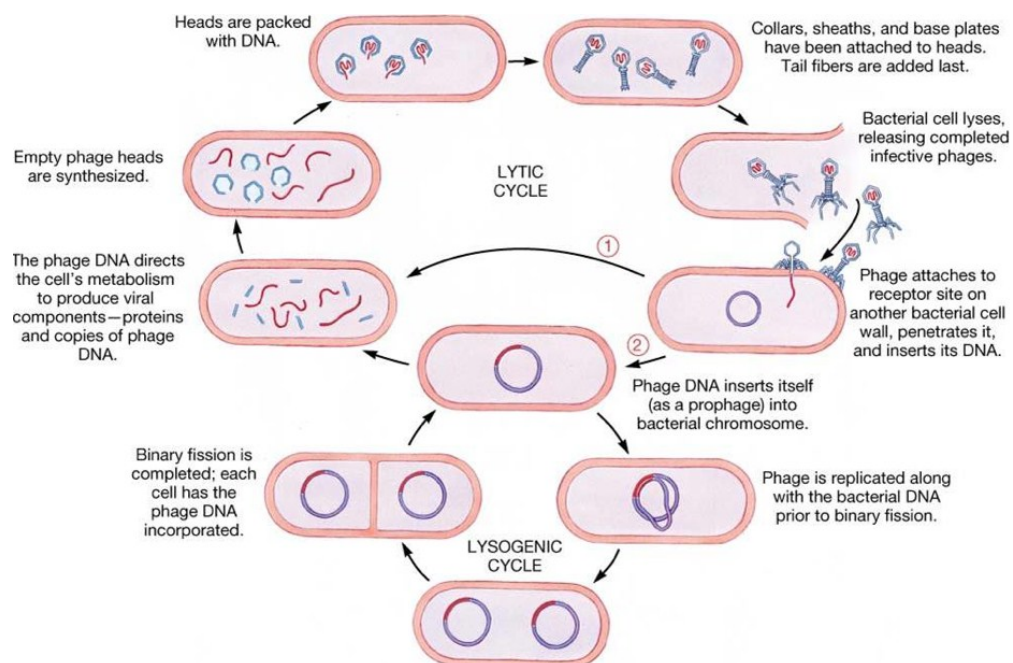
TCP fungerer som en spesifikk reseptor for bakteriofagen CTX ϕ som overfører genet for koleratoksinet til bakterien (Li et al., 2008). Hos de to biotypene, El Tor og klassisk, er TcpA-sekvensene 81 % identiske (Lim et al., 2010).

Koleratoksinet (CT)

Koleratoksinet er et eksotoksin som blir kodet av *ctxAB*-operonet, som er en del av genomet til fagen CTX ϕ (Waldor and Mekalanos, 1996; Heilpern and Waldor, 2000). Det er et AB-toksin som består av en A-subenhet og fem B-subenheter. B-subenheten gjenkjenner overflatemolekylene til vertscellene, som ofte er glykoproteiner eller glykolipider. B-subenhetene bindes til målcellen i tarmen, mens A-subenheten føres over plasmamembranen og inn i cytoplasma (Wilson et al., 2011). I cytoplasma aktiveres adenylcyclase av A-subenheten, som igjen konverterer ATP til cAMP. Økningen i cAMP fører til økt sekresjon av klorid- og bikarbonat-ioner fra mukosacellene i tarmen. Som følge av dette sekreseres store mengder med vann ut i lumen i tynntarmen. Tykktarmen klarer ikke å reabsorbere nok vann og det fører til stort væsketap (Madigan et al., 2009) (figur 2).



Figur 2 Figuren viser effekten av koleratoksinet i tarmen. (1) Normal ionediffusjon hvor Na^+ diffunderer fra tarmlumen til blod uten at Cl^- følger med. (2) *V. cholerae* koloniserer tarmen og produserer koleratoksinet. A-subenhetene er røde og B-subenhetene er grønne. (3) Etter at A-subenheten har passert cellemembranen aktiveres adenylcyclase som konverterer ATP til cAMP. (4) Na^+ blir blokkert fra å diffundere fra tarmlumen til blod og Cl^- og HCO_3^- -ioner skilles ut i tarmlumen. (5) Økt konsentrasjon av ioner i tarmlumen resulterer i at store mengder vann sekreses ut i tynntarmen (Madigan et al., 2009).



Figur 3 Livssyklusen til virus. Lytisk sykklus: bakteriofagen infiserer en vertscelle og injiserer sitt DNA. Fagets DNA rekombineres med vertscellens DNA, og får vertscellen til å lage kopier av fagets DNA og virale komponenter den trenger. Når fagene er pakket og klar lyserer vertscellen, nye bakteriofager frigjøres og syklusen kan gjentas. Lysogen sykklus: bakteriofagens DNA rekombineres med vertscellens DNA og replikeres som en del av vertscellen. De kan gå fra lytisk til lysogen fase og omvendt. Bildet er hentet fra (AlQasimTrust, 2012).

1.3 Bakteriofager

1.3.1 Generelle egenskaper

En av egenskapene som er viktig for bakterienes overlevelse og utvikling, er evnen til å ta til seg et nytt gen, horisontal genoverføring (HGT). HGT deles i 3 undergrupper:

1. Transduksjon – DNA overføres ved hjelp av bakteriofager.
2. Transformasjon – fritt DNA tas opp av kompetente bakterier fra det eksterne miljøet.
3. Konjugasjon – DNA overføres ved hjelp av et plasmid/transposon. Dette skjer ved direkte kontakt mellom cellene (Wilson et al., 2011).

Bakteriofager er virus som kan infisere bakterier. De er vanligvis spesifikke og infiserer kun sin målbakterie (Wilson et al., 2011). Fagene har to faser i livssyklusen: lytisk og lysogen. I den lytiske fasen replikeres fagene og vertscellene lyseres. I den lysogene fasen integreres fagens eget DNA inn i det bakterielle kromosomet, de kalles da for profag (figur 3). Fagene har evnen til å gå tilbake til lytisk fase, men kan også miste denne evnen (bli inaktive) hvis det oppstår mutasjoner i bakteriofagens genmateriale under bakteriens replikasjon. Genene fra bakteriofagen som integreres og uttrykkes i verten kan gi bakterien nye egenskaper (Wilson et al., 2011), som for eksempel antibiotikaresistens. Når bakterier blir transformert med DNA fra bakteriofager ved hjelp av transduksjon, kalles det for transfeksjon (Madigan et al., 2009).

Det finnes også flere bakterie-fag-interaksjoner som er kjent. Noen av disse kan også resultere i sykdom hos mennesker. Noen eksempler på dette er gitt i tabell 3.

Tabell 3 Bakterier som interagerer med bakteriofager.

Bakterie/art	Fag	Sykdomsfremkallende?	Referanse
<i>E. coli</i>	fd	Ja, diaré	(Hoogenboom et al., 1991)
<i>V. cholerae</i>	CTXφ	Ja, kolera	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	BS46		(Soothill, 1992)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>		Ja, difteri	(Folkehelseinstituttet)
<i>Myxococcus xanthus</i>	MX4		(Campos et al., 1978)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BS24		(Soothill, 1992)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	phi RsG1		(Duchrow and Giffhorn, 1987)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Q4		(Dabbs, 1987)
<i>Salmonella enterica</i>	ES18	Ja, diaré	(Casjens et al., 2005)
<i>Staphylococcus aureus</i>	φ-131	Ja	(Soothill, 1992)
<i>Xanthobacter autotrophicus GZ29</i>	CA3		(Wilke, 1980)

1.3.2 CTXφ

CTXφ er en filamentøs fag som infiserer *V. cholerae*. Fagen har en 6.9 kb enkelt-trådet-DNA som bærer genet for koleratoksinet (McLeod et al., 2005). I motsetning til andre fag blir filamentøse fag sekretet fra vertscellen og ikke frigjort fra vertscellen ved lysering. Dette gjør at nye CTXφ kan bli overført til nye verter. Samtidig kan DNA fra fagen som først infiserte vertscellen forbli inkorporert slik at koleratoksinet kan bli uttrykt (Davis and Waldor, 2003).

CTXφ benytter TCP som reseptor ved infeksjon av *V. cholerae*, men for effektiv infeksjon kreves det at bakterien også uttrykker proteinene TolQ, TolR, og TolA (TolQRA). Dette er reseptorproteiner som fagen binder seg til ved infisering. Det er også vist at det ikke alltid er nødvendig med uttrykk av TCP for at fagen skal kunne binde seg til bakterien, men uten TCP er det vist at transduksjonseffektiviteten blir kraftig redusert. Det antas at TCP hjelper til med å binde fagen fra avstand og deretter fører fagen inn til celleoverflaten, hvor fagen kan interagere med TolQRA. Ved fravær av TCP er det mulig at fagen kan finne veien til celleoverflaten og TolQRA på egenhånd, men med redusert effektivitet (Heilpern and Waldor,

2000).

Mutasjoner i kun *tolQRA*-genene har heller ikke vist seg å fjerne fagens evne til å infisere *V. cholerae* helt, men ved dobbeltmutasjoner i både *tcpA* og enten *tolQ*, *tolR* eller *tolA* derimot, er ikke CTXφ lenger infeksiøs. Det eksisterer også en teori om en alternativ rute for opptak av fag, styrt av andre proteiner (Heilpern and Waldor, 2000). Ved en delesjon av *tolA* derimot, er det vist at TolA ikke er nødvendig for at CTX skal kunne binde seg til *V. cholerae*, men det er viktig for effektiviteten for bakteriens opptak av fag (Ford et al., 2012). TolA-proteinet hos *V. cholerae* har likheter med TolA hos *E. coli*. Sekvensene i N-terminalen er 35% like, mens det i C-terminalen er 27% likhet (Ford et al., 2012). Hos *E. coli* består TolA av tre domener. N-terminalen (D1) som fester proteinet til cytoplasmamembranen, midtdomenet (D2) og C-terminalen (D3) som ser ut til å være i kontakt med yttermembranen. D1 og D2 er knyttet sammen via D3 (Lubkowski et al., 1999). Tilsvarende oppbygging av TolA-reseptor finnes på *V. cholerae* (Ford et al., 2012).

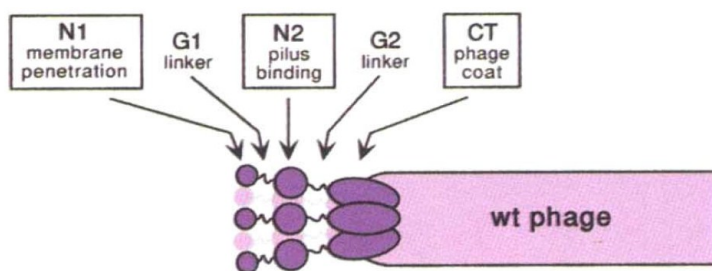
”Måten CTXφ infiserer *V. cholerae* på ser ut til å ligne Ff-fagenes infeksjon av *E. coli*. Begge fagene benytter pilus som reseptor, og begge krever at verten uttrykker TolQRA. Begge fagene koder også for et infeksjonsprotein som interagerer med reseptorproteinene (TolQRA). Proteinene hos *V. cholerae* var tidligere kjent som OrfU, men kalles også for pIII^{CTX}. Dette fordi det fungerer på samme måte som Ff pIII, som er involvert i infeksjonen av *E. coli*.” (Davis and Waldor, 2003). OrfU er vist å være nødvendig for produksjon av CTXφ hos *V. cholerae* (Heilpern and Waldor, 2003).

1.3.3 fd-fagen

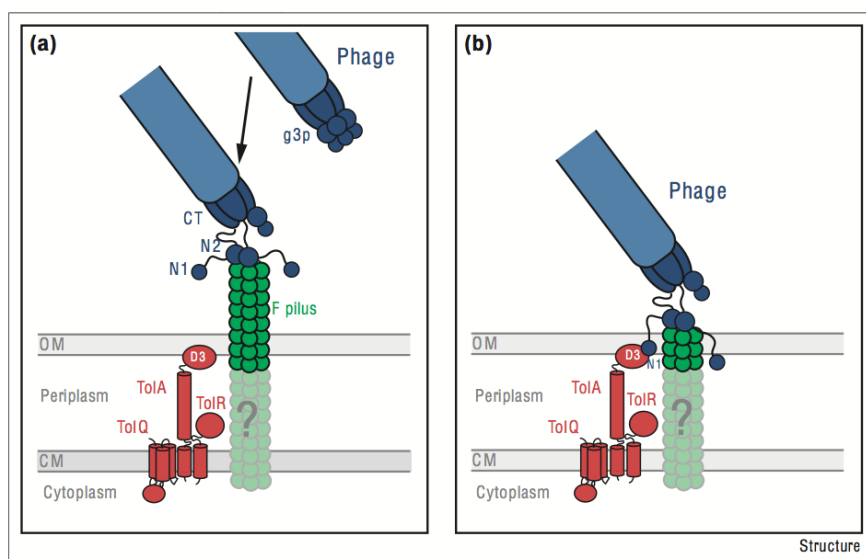
fd er en filamentøs bakteriofag som hører til gruppen Ff-fager, og som kan infisere *E. coli* (Hoogenboom et al., 1991). Fagen binder seg først til vertscellens pilus, F-pilus, med proteinet g3p/pIII (Riechmann and Holliger, 1997) som befinner seg på tuppen av fagen (Hoogenboom et al., 1991). Etter bindingen trekker F-pili seg tilbake til celleoverflaten og tar med seg fagen som kan passere cellemembranen (Riechmann and Holliger, 1997). fd krever også TolQRA for å kunne passere periplasma. Det er ikke nødvendig med binding til pilus, men infeksjonsfrekvensen blir lavere dersom pili ikke er involvert (Heilpern and Waldor, 2003).

Proteinet g3p/pIII på Ff-fagene består av tre domener: g3p-D1/N1 (residue 1-86), g3p-D2/N2 (residue 105-236) og g3p-D3/CT (residue 270-406). De første to er henholdsvis nødvendig for passering og absorpsjon (Lubkowski et al., 1999), mens CT er viktig for samling og frigjøring av Ff-fagene fra vertscellen (Heilpern and Waldor, 2003) (figur 4). CT spiller også en rolle for fag-morfologien, blant annet fag-kappen. Domenene forbindes via glysin-rike linker-regionene, G1 og G2. Det er observert at linker-regionene kan bidra til å øke fagenes infeksjonsevne ved at de fleksibelt kan justere avstanden til domenene ved pilus-binding. Hver ff-fag har tre enheter av g3p/pIII (Lubkowski et al., 1998).

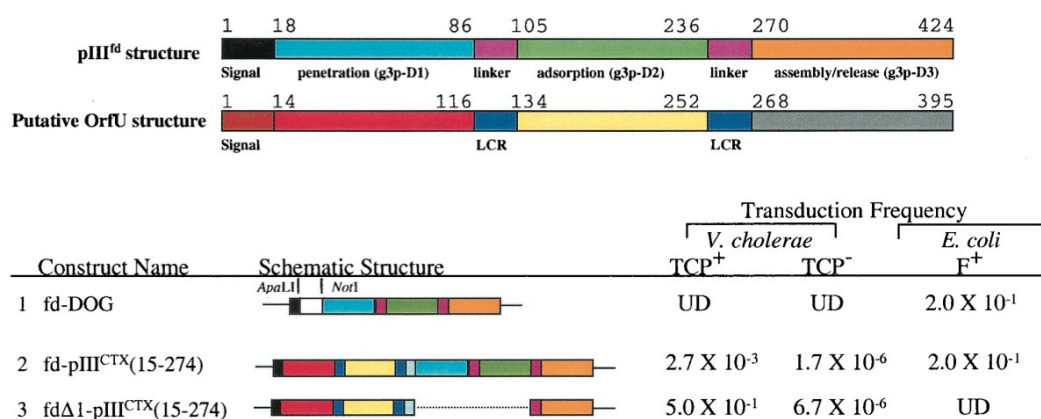
En foreslått mekanisme er at når Ff-fagen bindes til N2 (i F-pili) endres konformasjonen av g3p/pIII, så vil denne konformasjonsendringen avdekke bindingssetet for TolA i N1 (Lubkowski et al., 1999; Heilpern and Waldor, 2003). F-pili vil ved binding til fagen spontant trekkes tilbake og føre fagen til bakterieoverflaten. N1 vil på den måten komme i kontakt med TolA (Ford et al., 2012) ved å binde seg til den C-terminale delen (D3) (Lubkowski et al., 1999) (figur 5).



Figur 4 Illustrasjon av en filamentøs fag som innehar pIII proteiner på tuppen. pIII-proteiner består av tre domener; N1 = g3p-D1, N2 = g3p-D2, CT = g3p-D3. N1 er viktig for membranpenetrering, N2 er viktig for pilusbinding (Lubkowski et al., 1998), mens CT er viktig for samling og frigjøring fra vertscellen (Heilpern and Waldor, 2003), og spiller også en rolle for fag-morfologien, blant annet fagkappen. Det består også av G1 og G2 linker-regionene som binder domenene sammen. Bildet er hentet fra (Lubkowski et al., 1998).



Figur 5 Illustrasjon av Ff-fagens binding til F-pilus. (a) En Ff-fag bindes til tuppen av F-pilus ved hjelp av N2 på g3p/pIII. (b) N1 bindes til C-terminalen/D3 hos TolA (Lubkowski et al., 1999).



Figur 6 Den øverste figuren illustrer hvor de ulike domene ligger i proteinene hos *E. coli* (pIII), og *V. cholerae* (OrfU). 7.1) fd-dog. 7.2) fd_pIII^{CTX}(15-274) – hybriden av CTXφ og fd-dog etter at deler av OrfU er inkorporert. Illustrerer residuene 15-274, og hvor de er inkorporert i fd-dog. 7.3) Hybriden av CTXφ og fd-dog fdΔ1_pIII^{CTX}(15-274)/fd-Δ etter at g3p-D1 og g3p-D2 er fjernet. Tabellene til høyre viser transfeksjonsfrekvensen for de ulike fagene. TCP⁺ - *V. cholerae* O395. TCP⁻ - *V. cholerae* TCP2. *E. coli* F⁺ TGI+. (transduksjonsfrekvens = antall transduerte/antall mottakere) (Heilpern and Waldor, 2003).

1.3.4 fdΔ1_pIII^{CTX}(15-274)

1.3.4.1 fd_pIII^{CTX}(15-274)

Heilpern og Waldor hadde som hypotese at CTXφ har et protein som fungerer likt som pIII hos *E. coli*, ettersom det er store likheter mellom Fφ og CTXφs infeksjon av *E. coli* og *V. cholerae*. De foreslo derfor at OrfU/pIII^{CTX} kunne være pIIIIs ekvivalent, fordi de har lik størrelse og posisjon innenfor hvert sitt genom. For å teste ut hypotesen om at OrfU/pIII^{CTX} er involvert i CTXφs infeksjon av *V. cholerae*, klonet de OrfU/pIII^{CTX} inn i pIII hos fd-dog, derivaten av fd. Fagen (fd_pIII^{CTX}(15-274)) viste seg å kunne infisere både F⁺ *E. coli* og TCP⁺ *V. cholerae* (Heilpern and Waldor, 2003).

1.3.4.2 fdΔ1_pIII^{CTX}(15-274)

For å være sikre på at pIII-delen som er en del av OrfU-pIII-kombinasjonen ikke bidro til infeksjon av *V. cholerae* i fd_pIII^{CTX}(15-274), konstruerte derfor Heilpern og Waldor en derivat av denne. De fjernet g3p-D1 og g3p-D2 og det viste seg å øke infeksjonsfrekvensen med *V. cholerae* (figur 6). De to første domenene i pIII har derfor ingenting å si for infeksjonsevnen til fagen av *V. cholerae*, men fjernet evnen til å infisere *E. coli*. De viste også med dette at andre proteiner på CTXφ ikke er nødvendig for fags infeksjon av *V. cholerae* (Heilpern and Waldor, 2003).

1.4 Oppgavens mål

Bakteriofagers interaksjoner med bakterier er generelt kjent, men man vet lite om hvordan CTXφ faktisk binder seg til *V. cholerae*. Som nevnt tidligere i innledningen, sammenlignes *V. cholerae*s interaksjon med fd og *E. coli* siden det er vist at de krever de samme komponentene hos både fag og bakterie for å kunne gjennomføre en vellykket transfeksjon. Ettersom fd binder seg til F-pili for deretter å bli ført til celleoverflaten eksisterer en teori om at CTXφ også må binde seg til TCP hos *V. cholerae*.

Hovedhypotesen i denne oppgaven er derfor: CTXφ binder seg til TcpA i TCP hos *V. cholerae* for effektiv transduksjon.

For å prøve å svare på dette ble det benyttet fd-Δ som er en hybrid mellom fd og CTXφ. OrfU/pIII^{CTX} er den delen som antas å ha størst betydning for infeksjon av *V. cholerae* hos CTXφ, og er derfor klonet inn i fd. Resten av fagkappen består av pVIII fra fd-fag som det finnes gode antistoffer mot. Dette kan benyttes i immunogull-merking i en transmisjonselektronmikroskoperingsanalyse for å skille dem mellom filamentøse fag og TCP ettersom gode antistoff mot pVIII hos CTXφ ikke finnes. Det ble også benyttet ulike mutanter av villtypen *V. cholerae* O395, med mutasjoner i TcpA for å mulig detektere hvilke aminosyrer som er viktig for fagbinding.

Målene med denne oppgaven er å dokumentere om fd-Δ kan benyttes i bakterie-fag-interaksjonsstudier med *V. cholerae* istedenfor CTXφ, og finne ut hvor fagene binder seg på bakterien og eventuelt TCP.

2 Materialer

2.1 Bakteriestammer

Tabell 4 Oversikt over bakteriestammer benyttet i arbeidet. 1. Viser transfeksjonsfrekvensen i forhold til villtype *V. cholerae* O395. 2. Agglutineringsfrekvens i forhold til O395. *(+) frekvensen er et veldig lavt estimat.

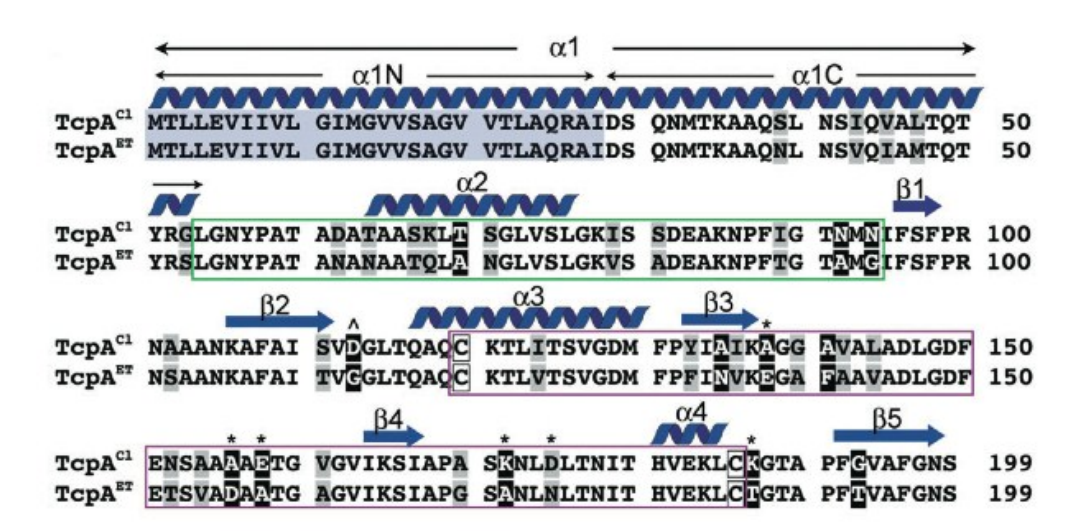
Art/Stamme	Karakteristika	Tra.frek. m/CTX ¹	Agg. ²	Pili
<i>Vibrio cholerae</i>				
O395	Villtype, klassisk ^a	+++	+++	bunter ^a
C6706	Villtype, El Tor ^b		+ ^b	kryssbindinger /bunter ^b
C6706luxO	$\Delta luxO^j$			
ML12 pmT5toxT	TcpA D175N ^b		++ ^b	bunter ^b
ML19	TcpA K68A ^c	++ ^c	++ ^c	bunter ^c
ML21	TcpA R26E ^c	ID ^c	- ^c	Nei ^c
ML23	TcpA E83R ^c	+ ^c	+ ^c	bunter ^c
ML24	TcpA R26E, E83R ^c	+ ^c	+ ^c	bunter ^c
TolA	$\Delta tolA::pDH149^{h,i}$	(+) ^{h*}		
Tcp2	$\Delta tcpA$, fravær av TCP ^d	(+) ^{h*} og - ^f		
Tcp2, TolA	$\Delta tcpA, tolA::pDH149^h$	ID ^h		
RT4015	TcpA D146A ^e	ID ^e	- ^e	få, små bunter ^e
RT4016	TcpA D149A ^e	+ ^e	- ^e	få, ingen bunter ^e
RT4017	TcpA E158L ^e	++ ^e	- ^e	bøyde, bundet sammen ^e
SC254	TcpA V20T ^e	+ ^e og ++ ^f	- ^e	bølgete ^e
LC12 pMT5toxT	TcpA A156D/E158A/ K172A/D175N ^b		++ ^b	kryssbindinger /bunter ^b
LC13 pMT5toxT	TcpA A138E/A156D/E158A/ K172A/D175N ^b		+ ^b	kryssbindinger /bunter ^b
LC16 pMT5toxT	TcpA A138E/A156D/E158A/ K172A/D175N/K187T ^b		+ ^b	kryssbindinger /bunter ^b
RT4225 pMT5toxT	TcpA H181A ^c	- ^e	++++ ^e	bunter ^e
O395lacI pCTX ϕ kmR	Fagproduserende ^f	-		

<i>E. coli</i>				
TG1	f1+ ^k	F-pili ^l		
DH5αpir fd-DOG	fd-dog ^k	-		
DH5αpir fdΔ1_pIII ^{CTX} (15-274)	fdΔ1_pIII ^{CTX} (15-274) ^g	-		
a (Taylor et al., 1987) b (Lim et al., 2010) c (Li et al., 2008) d (Herrington et al., 1988) e (Kirn et al., 2000) f (Waldor and Mekalanos, 1996)		g (Heilpern and Waldor, 2003) h (Heilpern and Waldor, 2000) i (Mathur and Waldor, 2004) j (Vaitkevicius et al., 2006) k (Hoogenboom et al., 1991) l (Lubkowski et al., 1999)		

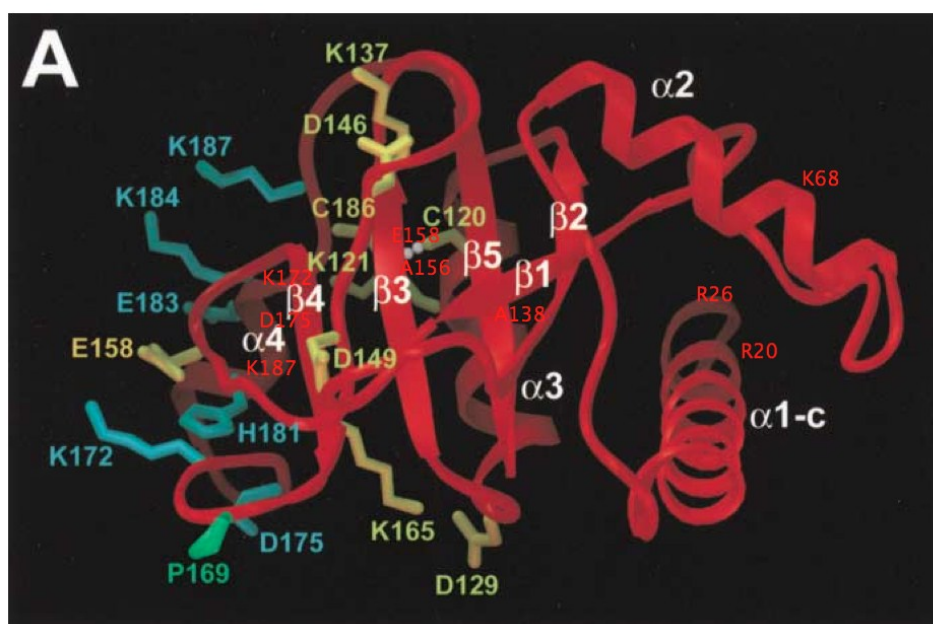
Transfeksjons- og agglutineringsfrekvensen er hentet fra flere arbeid og metodene kan derfor også avvike fra hverandre. Mutantenes egenskaper er satt i forhold til villtype *V. cholerae* O395 og forsøkt konvertert slik at verdiene fra de ulike artiklene kan tolkes under ett. *tcpA*-mutasjoner angis i tabellen med aminosyreposisjon med opprinnelig aminosyre til venstre og aminosyresubstitusjonen til høyre. For full liste av aminosyrer se vedlegg 1.

pCTXφ:kmR som ble benyttet i denne oppgaven er et derivat av CTXφ som er kanamycinresistent (Waldor and Mekalanos, 1996). fd-dog som ble benyttet i denne oppgaven, er en derivat av fd-fagen som er tetracyklinresistent (Zacher 3rd et al., 1980). Hybriden mellom CTXφ og fd, fdΔ1_pIII^{CTX} (15-274) kalles også for fd-Δ i denne oppgaven.

Aminosyresekvensene til *V. cholerae* klassisk og El Tor er gitt i figur 7. *tcpA*-mutasjonene er plassert i krystallfiguren av TcpA i figur 8.



Figur 7 Aminosyresekvensene til TcpA for villtype klassisk *V. cholerae* O395 (CL) og El Tor C6706 (ET). TcpA-sekvensene til disse to biotypene er 81% identiske. LC-stammene har fått mutasjoner fra klassisk til El Tor, og aminosyrene det gjelder er merket med * i sekvensen. (Lim et al., 2010).



Figur 8 Krystallstruktur av TcpA (Craig et al., 2003). TcpA-mutantenes mutasjoner er plassert på krystallstrukturen etter aminosyresekvensen fra Lim et al. (2010).

2.2 Antibiotika

Tabell 5 Oversikt over antibiotika benyttet i arbeidet.

Antibiotika	Stamløsning	Løsningsmiddel	Produktnummer	Produsent
Ampicillin	100 mg/ml	MQ (autoklavert)	A9518-5G	Sigma-Aldrich
Kanamycin	50 mg/ml	MQ (autoklavert)	60615-5G	Sigma-Aldrich
Streptomycin	200 mg/ml	MQ (autoklavert)	S9137-25G	Sigma-Aldrich
Tetrasyklin	12 mg/ml	50 % etanol	T3383-25G	Sigma-Aldrich

Antibiotika-stamløsninger (tabell 5)

1. Mengden tørrstoff ble veid.
2. Tørrstoffet ble løst i løsningsmiddelet.
3. Blandet til alt ble oppløst.
4. Etterfylt med løsningsmiddel til riktig mengde.
5. Sterilfiltrert 0.22 µm.
6. Fordelt i 1.5 ml mikrosentrifugerør og oppbevart ved -20°C. Tetrasyklin som er lyssensitivt, ble i tillegg pakket inn i aluminiumsfolie.

2.3 Kjemikalier

Tabell 6 Oversikt over kjemikalier som ble benyttet i arbeidet. *Antistoffet ble laget ved å immunisere en kanin/hare.

Kjemikalium	Produktnummer	Produsent
10 nm protein A gull		CMC University of Utrecht
2-mercaptoethanol	M3148-100ML	Sigma-Aldrich
Agar bacteriological	LP0011	Oxoid
Ammoniumklorid (NH ₄ Cl)	A9434-500G	Sigma-Aldrich
Anti-Rabbit IgG (whole molecule) F(ab-) ₂ fragment alkaline phosphatase	A3937-25ML	Bio-Rad
anti-TcpA- antistoff*		(Sun et al., 1990)
antistoff mot fag (Monoklonalt antistoff som gjenkjenner pVIII hos M13, fd, F1)	6109	Progen Biotechnik
Bovin serum albumin (BSA)		
BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt)		
Bio-Safe™ Coomassie G-250 stain	161-0786	Bio-Rad
bromphenol blått		Merck
Buph™ Tris-HEPES-SDS Running Buffer	28398	Thermo Scientific Pierce
casamino acids	223050	Becton, Dickinson and Company (BD)
Di-natriumhydrogenfosfat dihydrat (Na ₂ HPO ₄) x	28029.292	PROLAB

2H ₂ O		
Ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA)	431788-100G	Sigma-Aldrich
D(+)-glucose monohydrate	1083421000	Merck
Gjærekstrakt	LP0021	Oxoid
glutaraldehyd		Electron Microscopy Sciences
Glyserol 87%	24 385.295	Prolab
HCL		
IPTG (isopropylthio-β-galactoside)	I1000-5	Saveen Werner AB
Kalium-di-hydrogenfosfat (KH ₂ PO ₄)	A0104673	Merck
Kalsiumklorid (CaCl ₂) (Ferdiglaget)		
Magnesiumsulfat (MgSO ₄) (Ferdiglaget)	M7506-500G	Sigma-Aldrich
MgCl ₂		
Metanol	1.06009.2500	Merck
Natriumklorid (NaCl)	1.06404.1000	Merck
nitrotetrazodium blue chloride (NBT)	N6876-500MG	Sigma-Aldrich
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	161-0374	Bio-Rad
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	L3771-500G	Sigma-Aldrich
TolA-C (opprenset C-terminal av TolA)		Lisa Craig
Tris base (Trizma® base, 2-amino-2(hydroxymethyl)-1-3-propanediol)	T1503-5KG	Sigma-Aldrich
Trizma® Hydrochhloride eller Tris-HCL (Tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride)	T-3253	Sigma-Aldrich
Trypton	LP0042	Oxoid
Tween 20	437082Q	Prolab
uranylacetat	94260	Fluka
Paraformaldehyd	15713-S	Electron Microscopy Sciences
10XTG (Tris-glycine Buffer)		Bio-Rad

2.4 Laboratorieutstyr

Tabell 7 Oversikt over laboratorieutstyr benyttet i arbeidet.

Utstyr	Modell	Produsent
Autoklav	Touchclave-lab	LTE
Blotte-/overføringsapparat		BIORAD
Transmisjonslektronmikroskop	Fei CM100 / CM200	
Fryser (-80°C)	-86 Freezer	Forma Scientific
Inkubator (37°C, 225 rpm)	Innova™ 4200, Incubator shaker	New Brunswick Scientific
Inkubator (37°C)		Termaks
Inkubator med roterende hjul	Hiriom	Gran Boeckel
Inkubator	C24 Incubator shaker	New Brunswick Scientific
LAF-benk	Model 0.9	Holten Laminair
Mikrobølgeovn		Electrolux
pH-meter	744 pH Meter	Metrohm
Pipetter		Eppendorf
Rystebord/vippebord	Typ 3011, NO10262098E	GFL
Roterende hjul	Model L26. Cat. No 26000	Labinco B.V
Rullebord	Roller mixer SRT9	Stuart
Bordsentrifuge		Labnet
Spektrofometer	Bio Photometer	Eppendorf
Vannbad	1083	GFL
Varmeblokk		Grant Boeckel
Varmeplate		Kika Labortechnik
Vekt	Sartorius basic	Kebo Lab AS
Vortex (IKA® MS3 basic)	MPR-555-050L	Janke and Kunkel

2.5 Diverse utstyr

Tabell 8 Oversikt over diverse utstyr benyttet i arbeidet.

Utstyr	Modell/Produktnummer	Produsent
96-brønners mikrotiterplate		NUNC
Engangskyvetter	634-2501	VWR
PVDF Transfer membrane (Amersham Hybond™-P)	RPN303F	GE Healthcare
Sprøyte, 1, 5 og 10 ml	300013, 302187, 302188	BD Plastipak
Whatman filter 0,2 µm, Puradisc 30	10462200	Whatman®
Podeøse, 1 µl og 10 µl (engangs)	254410, 254437	Nunc
Parafilm® M	01852-AB	Pechiney Plastic Packaging
Petriskåler		
Cryorør 2 ml	89020	TPP
Rør, 15 ml og 50 ml	430053, 430291	Corning®
Pinsetter		
kobber mesh grids	formvar-coated med karbon 5 nm	Electron Microscopy science
gridboks		Leica
4-20% Precise™ Protein Gels (10 well)	25204	Thermo Scientific Pierce
Pipette 2, 5, 10 og 25 ml	CLS4486, CLS4487, CLS4100, CLS4489	Corning®
Whatman filterpapir		Whatman®
Kolber 1, 2 L		

2.6 Medier og løsninger

Luria Bertani (LB), pH 6.5, 1 L

10 g Trypton

5 g Gjærekstrakt

10 g Natriumklorid (NaCl)

Løst i 900 ml MQ-vann under oppvarming. Volumet ble justert til 1000 ml. pH ble justert til 6.5. Autoklavert og oppbevart ved 4°C.

Luria Agar (LA), 1 L

10 g Trypton

5 g Gjærekstrakt

12.5 g Bactoagar

10 g Natriumklorid (NaCl)

Løst i 900 ml MQ-vann under oppvarming, til rett under kokepunktet. Volumet ble justert til 1000 ml. Autoklavert og oppbevart ved 4°C.

M9 stock-løsning, 1 L

60 g Di-natriumhydrogenfosfat (Na_2HPO_4)

30 g Kalium-di-hydrogenfosfat (KH_2PO_4)

5 g Natriumklorid (NaCl)

10 g Ammoniumklorid (NH_4Cl)

Løst i MQ-vann. Volumet ble justert til 1000 ml. Autoklavert og oppbevart ved 4°C.

M9-vekstmedie, 100 ml

10 ml M9 stock-løsning

100 μl 1M Magnesiumsulfat (MgSO_4)

100 μl 0.1M Kalsiumklorid (CaCl_2)

500 μl 20 % casamino acids

1 ml 20 % glukose

89.3 ml Sterilt MQ-vann

M9-agar base, 100 ml

1.5 g bactoagar

90 ml MQ-vann

Agaren ble løst i MQ-vannet under oppvarming til rett under kokepunktet. Autoklavert og oppbevart ved 4°C.

Ved bruk av agar-basen ble den varmet opp i mikrobølgeovn. Da agaren var omtrent 50°C, ble det tilsatt:

10 ml M9 stock-løsning

100 µl 1M Magnesiumsulfat (MgSO_4)

100 µl 0.1M Kalsiumklorid (CaCl_2)

500 µl 20% Casamino acids

1 ml 20% Glukose

PBS (phosphate buffered saline), 1L

8 g Natriumklorid (NaCl)

0.2 g Kaliumklorid (KCl)

1.44 g Di-natriumhydrogenfosfat (Na_2HPO_4)

0.14 g Kalium-di-hydrogenfosfat (KH_2PO_4)

Løst i MQ-vann 800 ml.

Volumet ble justert til 1000 ml. pH ble justert til 7,4 med hydroklorid (HCl). Autoklavert og oppbevart ved 4°C.

IPTG (isopropylthio-β-galactoside) 100 mM stockløsning

24 mg IPTG ble løst i sterilt MQ-vann til 1 ml. Løsningen ble deretter steriltfiltrert og oppbevart ved 4°C.

Fish skin gelatine (FSH)

Ferdiglaget på laboratoriet.

Protein Sample buffer, 10 ml

(ble oppbevart og tilsatt i avtrekk på grunn av beta-mercaptoethanol):

6 ml 10 % Sodium dodecyl sulfate (SDS) (anionsk løsningsmiddel)

3 ml glycerol (øker prøvens tetthet slik at det legger seg fint i brønnen)

1.9 ml 1.0 M Tris-HCl pH 6.8

0.3 ml 0.2 M EDTA

3 ml 2-mercaptoethanol (reduserer S-S-bindinger, intra- og interbindinger brytes opp og

gir flere subenheter)

0.8 ml H₂O

Kapillær med pulver av bromphenol blått (Negativt ladet, følger med på prøvens vandring)

For dette ble følgende løsninger laget og autoklavert:

100 ml 10 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)

100 ml 1.0 M Tris-HCl pH 6.8

100 ml 0.2 M Ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA)

Blottebuffer

100 ml 10XTG (tris-glycine buffer)

700 ml dH₂O

200 ml Metanol

Holdbar i 14 dager.

Buph™ Tris-HEPES-SDS Running Buffer

Pulveret ble løst i henhold til produsentens (Thermo Scientific Pierce) bruksanvisninger.

(vedlegg 2)

Western Blokkebuffer (WBB), 1 liter

10 ml 1 M Tris-HCl pH 7.8

100 ml 5 M Natriumklorid (NaCl)

5 ml Tween 20

Tilsatte sterilt MQ-vann til 1 liter.

For dette ble følgende stock-løsninger laget og autoklavert:

100 ml 1 M Tris-HCl pH 7.8

1 liter 5 M Natriumklorid (NaCl)

1 liter autoklavert MQ

En tom 1 liter flaske ble autoklavert.

Western fremkallingsbuffer

1. Løste 6.05 g Tris base i 1 liter vann og autoklaverte.

2. Tilsatte 3 ml 1 M Magnesiumklorid (MgCl₂)

For dette ble følgende løsning laget og autoklavert:

100 ml 1 M Magnesiumklord (MgCl_2)

Western fremkallingsvæske

Ble laget fersk til bruk hver gang.

9 ml Western fremkallingsbuffer.

1 ml 0.1 % NBT (nitrotetrazodium blue chloride løst i EtOH). Ferdiglaget på laboratoriet.

Oppbevart ved 4°C.

100 ul 5 mg/ml BCIP (løst i di-methyl formamid). Ferdiglaget på laboratoriet. Oppbevart ved 4°C.

3 Metoder

3.1 Lagring og kultivering

3.1.1 Langtidslagring av *V. cholerae* og *E. coli*

Til langtidslagring ble det laget stamløsninger med 800 µl bakteriekultur og 150 µl 99.5% glyserol, til en sluttkonsentrasjon på 15 % glyserol i cryorør. Bakteriene ble lagret ved -80°C.

3.1.2 Kultivering av bakteriene

Escherichia coli

E. coli ble dyrket opp på LA med hensiktsmessig antibiotika (tabell 9) over natt i inkubator (37°C). Til forsøk ble *E. coli* dyrket opp på M9-agar.

Til forsøk ble følgende metode brukt:

1. En steril podeøse (10 µl) ble brukt til å plukke opp en enkeltkoloni.
2. Inokulert i 5 ml LB med kanamycin 50 µg/ml over natten i rysteinkubator (37°C, 225 rpm).
3. Dagen etter ble 60 µl bakteriekultur inokulert i 3 ml M9-medie og inkubert i rysteinkubator i 4 timer (37°C, 180 rpm).

Vibrio cholerae

V. cholerae ble dyrket opp på LA med hensiktsmessig antibiotika over natt i inkubator (37°C).

Til forsøk og for å indusere frem uttrykkelse av pili hos *Vibrio cholerae* følgende metode brukt:

1. En steril podeøse (1 µl) ble brukt til å plukke opp en enkeltkoloni.
2. Det ble gjort 5 utstryk på en ren agarplate for å få et så tynt inokulat som mulig.
3. Inokulert i 3 ml LB med pH = 6.5 og hensiktsmessig antibiotika (tabell 9).
4. Ble inkubert over natten i inkubator med rolig rotering i et hjul (Hiriom, Gran Boeckel) i 16 timer (30°C, 5 rpm).

Tabell 9 Oversikt over antibiotika som ble brukt ved selektiv dyrking av bakteriestammene. amp – ampicillin, kan – kanamycin, strp – streptomycin, tet – tetracyklin.

Art/Stamme	Medie	Antibiotika, konsentrasjon i µg/ml
<i>E. coli</i>		
TG1 f1+	M9	-
DH5αpir fd-DOG	LB	tet 12 µg/ml
DH5αpir fdΔ1_pIII ^{CTX} (15-274)	LB	tet 12 µg/ml
<i>V. cholerae</i>		
O395lacI pCTXφkmR	LA og LB	kan 50 µg/ml
O395	LA og LB	strp 200 µg/ml
C6706	LA og LB	strp 200 µg/ml
C6706luxO	LA og LB	strp 200 µg/ml
ML12	LA og LB	strp 200 µg/ml
ML19	LA og LB	strp 200 µg/ml
ML21	LA og LB	strp 200 µg/ml
ML23	LA og LB	strp 200 µg/ml
ML24	LA og LB	strp 200 µg/ml
TolA	LA og LB	strp 200 µg/ml
Tcp2	LA og LB	strp 200 µg/ml
Tcp2,TolA	LA og LB	strp 200 µg/ml
RT4015	LA og LB	strp 200 µg/ml
RT4016	LA og LB	strp 200 µg/ml
RT4017	LA og LB	strp 200 µg/ml
SC254	LA og LB	strp 200 µg/ml
LC12	LA og LB	strp 200 µg/ml eller amp 100 µg/ml
LC13	LA og LB	strp 200 µg/ml eller amp 100 µg/ml
LC16	LA og LB	strp 200 µg/ml eller amp 100 µg/ml
RT4225	LA og LB	strp 200 µg/ml eller amp 100 µg/ml

3.2 Fagsuspensjon

Protokoll:

Fagproduserende bakterier (*V. cholerae* O395 Δ lcl pCTX ϕ kmR, *E. coli* DH5 α pir fd-DOG og *E. coli* DH5 α pir fd Δ _pIIICTX (15-274) som gir henholdsvis pCTX ϕ :kmR, fd-dog og fd Δ 1_pIII^{CTX} (15-274)) ble inokulert i 5 ml LB-medie med seleksjon (tabell), og satt til vekst over natten i rysteinkubator (37°C, 225 rpm).

1. 2 x 1.5 ml bakteriekultur ble sentrifugert i 6 minutter ved 10 000 rpm i en mikrosentrifuge.
2. Supernatanten ble sterilfiltrert, 0.22 μ m.
3. Fagsuspensjonene ble oppbevart i kjøleskap ved 4°C.

3.3 Transfeksjonsforsøk

Protokoll:

1. 75 μ l bakteriekultur (beskrevet over under 3.1.2) ble mikset med 75 μ l fagsuspensjon.
2. Bakterie-fagsuspensjon ble lett rystet på et roterende hjul (Labinco B.V) i 20 minutter i romtemperatur.
3. Suspensjonen ble fortynnet fra 1 til 1×10^{-8} .
4. Dråper på 5 μ l ble pipettert ut på LA-plater med seleksjon (tabell 10). For å finne totalt antall mottaker celler ble de fem høyeste fortynningene pipettert ut på en skål. For å finne totalt antall celler ble de fem laveste fortynningene pipettert ut på en annen skål. Fortynningene ble pipettert på skålen slik at det ble fem separate dråper, i synkende rekkefølge. Skålene ble holdt i vinkel slik at dråpene kunne fordele seg jevnt utover, og danne fem separate kolonner som letter tellingen.
5. Platene ble inkubert over natten ved 37 °C.
6. Koloniene ble talt og transfeksjonsfrekvensen ble beregnet (= antall infiserte/antall mottakere).

Internkontroll: fd- Δ for *E. coli*. *V. cholerae* O395 for *V. cholerae*-mutantene.

Ekspresjonen av koleratoksinet (CT), TCP og de andre virulensfaktorene reguleres av membranproteinet ToxR, som lar seg stimulere av miljøet bakterien er i. Utenfor verten er det lite eller ingen uttrykk, mens i verten (tarmen) er det høyt nivå (Schuhmacher and Klose, 1999). ToxR setter i gang en kaskadereaksjon og aktiverer uttrykkelsen av ToxT, og ToxT aktiverer igjen uttrykk av virulensfaktorene, blant annet TCP (Murley et al., 1999).

Transfeksjonsforsøkene med LC12, LC13, LC16 og RT4225 ble gjennomført med og uten 1 mM IPTG parallellt, fordi disse inneholder plasmidet pMT5 som koder for transkripsjonsaktivatoren ToxT (Lim et al., 2010). *toxT* er klonet nedenfor *Ptac*-promotoren på plasmidet pMT5 (DiRita et al., 1996). *Tac*-promoteren er en hybrid mellom *trp*- og *lac*-promotere. *Lac*-promotoren kommer fra *lac*-operonet (De Boer et al., 1983).

Lac-operonet lar seg regulere av laktose-nivået i cellen. Laktose kontrollerer transkripsjonen av *lac*-operonet via *lac*-repressoren. Ved høye laktose-konsentrasjoner øker konsentrasjonen av allolaktose som vil binde seg til *lac*-repressoren, og fjerne det fra DNA, slik at DNA er tilgjengelig for RNA-polymerase. *LacZ* som er det første genet i operonet, koder for β -galactosidase som bryter ned laktose til galaktose og glukose (Alberts et al., 2004). Ettersom *toxT* er blitt klonet inn i plasmidet pMT5 etter *Ptac*-promoteren, kan man inducere ToxT uavhengig av ToxR. Ettersom IPTG er en laktoseanalog fungerer den som en inducer for ToxT, og vi ønsket derfor å se om IPTG ville ha effekt på uttrykkelsen av pili og ToxT.

Tabell 10 Oversikt over antibiotika brukt i agarplater ved transfeksjonsforsøk. *Disse stammene ble gjennomført med og uten 1 mM IPTG. I platene for å selektere antall transformerte indusert med IPTG ble det i tillegg brukt ampicillin eller streptomycin. amp – ampicillin. kan – kanamycin. strp – streptomycin. tet – tetracyklin.

Art/Stamme	Fag	Antib. for å selektere antall mottakere	Antib. for å selektere antall transfekterte
<i>V. cholerae</i>			
O395, MLer C6706, C6706luxO	CTX	strp 200 µg/ml	kan 50 µg/ml
	fd-dog, fd-Δ	strp 200 µg/ml	tet 1.2 µg/ml
RT4015, RT4016, RT4017, SC254	CTX	strp 200 µg/ml	kan 50 µg/ml
	fd-dog, fd-Δ	strp 200 µg/ml	tet 1.2 µg/ml
* LC12, LC13, LC16, RT4225	CTX	amp 100 µg/ml eller strp 200 µg/ml	kan 50 µg/ml, og amp 100 µg/ml eller strp 200 µg/ml
	fd-dog, fd-Δ	amp 100 µg/ml eller strp 200 µg/ml	tet 1.2 µg/ml, og amp 100 µg/ml eller strp 200 µg/ml
<i>E. coli</i>			
TG1 f1+	fd-dog, fd-Δ	LA	tet 12 µg/ml

Transfeksjonsforsøk med O395 og opprenset C-terminal del av TolA.

1. 3 µl av His-TolA-C (100 µM) eller buffer (kontroll) ble tilsatt 75 µl av fagsuspensjonen i et mikrosentrifugerør.
2. Inkubert i 30 minutter i romtemperatur på et roterende (Labinco B.V) hjul.
3. Deretter ble transfeksjonsforsøket gjennomført som beskrevet over.

3.4 Gelelektroforese

3.4.1 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Gelelektroforese er en metode som benyttes for å separere proteiner fra hverandre, slik at man kan studere subkomponentene eller rense opp proteiner til videre bruk. Prøvene blir applisert i brønner i en gel, og et elektrisk spenningsfelt settes på. Prøvene vil deretter vandre og separeres etter ladning og størrelse (Gallagher, 2007).

Det finnes ulike måter å utføre gelelektroforese på, og man kan blant annet behandle prøvene med natrium dodecylsulfat (SDS), som er et sterkt anionsk løsningsmiddel. Ved høy pH vil det åpne cellevegger, og denaturere kromosomalt DNA og proteiner. Proteinene vil folde seg ut, og SDS vil dekke dem med negativ ladning. I et elektrisk felt vil proteinene derfor kun migrere etter størrelse (Sambrook and Russel, 2001).

Hvor langt og raskt proteinene migrerer avhenger av polyakrylamid konsentrasjonen. I lavere konsentrasjoner vil proteinene vandre raskere gjennom gelen. Med en gradient-gel, som øker i tetthet nedover gelen med en viss prosent, vil man også kunne separere proteiner av ulik størrelse bedre som resulterer i klarere og tydeligere bånd. Sammen med prøvene tilsettes det en standard som også vil separeres på samme måte. Molekylvekten til proteinene i standarden er kjent, og man kan på den måten sammenligne med prøvene og raskt finne proteinene man er ute etter. Denne metoden ble benyttet for å se på TcpA-uttrykket hos *V. cholerae* O395 i pH 6 mot pH 8, og hos mutantene som inneholder plasmidet pMT5.

Protokoll: prøvebehandling

1. *Vibrio cholerae* ble grodd opp under pili-induserende forhold, og OD (optical density) ble justert slik at kulturene hadde lik OD (0.5) ved prøvepreparering.
2. 1 ml av bakteriekulturen ble overført til 1.5 ml mikrosentrifugerør og sentrifugert ved 10 000 rpm, 7176 G i 4 minutter.
3. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble først resuspendert i 40 µl MQ-vann og deretter tilsatt 40 µl protein sample buffer.
4. Prøvene ble varmet opp på varmeblokk i 10 minutter (92°C) og sentrifugert ned i 1 min.
5. Til langtidslagring ble de oppbevart i fryser ved -20°C.

Protokoll: gelkjøring

Standard: 5 µl MWM (Molecular Weight Marker) + 10 µl protein sample buffer.

15 µl av hver prøve ble applisert på SDS-PAGE i hver sine brønner.

Gelen ble først kjørt i 15 minutter ved 60 V for å samle prøven ned i brønnen, deretter rundt 50 minutter ved 150 V. Gelen ble kjørt i Buph™ Tris-Hepes-SDS Running Buffer.

3.4.2 Immunoblott (Western blott)

Etter gelkjøring kan man overføre proteinene til en membran hvor man deretter kan detektere dem med antistoff. Det ble benyttet to typer membraner, polyvinylidene difluoride (PVDF) og nitrocellulose. PVDF har høyere retensjon og binder proteinene kraftigere (Ursitti et al., 1995).

Klargjøring av PVDF-membranen

1. PVDF-membranen ble lagt i et lite kar med blottebuffer i minst 10-20 minutter.
2. PVDF-membranen ble bløtlagt i 100 % metanol i 10 sekunder.
3. Deretter ble membranen vasket i destillert vann i 5 minutter.
4. Til slutt ble membranen lagt i blottebuffer i 10 minutter.

Klargjøring av nitrocellulose-membranen

1. Membranen ble fuktet godt før blottingen med blottebuffer.

Felles protokoll:

5. Proteinene ble overført fra gelen til membranene i et blotte-/overføringsapparat sammen med blottebuffer ved 400 mA i 1,25 – 1,5 time ved 4°C.
6. Etter overføringen ble membranen lagt i 50 ml rør med skrukork.
7. Membranene ble vasket i Western blokkebuffer (WBB) med 3% bovin serum albumin (BSA) i 2 x 15 min på et rullebord (Roller mixer SRT9, Stuart) i romtemperatur.
8. Anti-TcpA antistoff 1:2500 fortykning ble tilsatt til 10 ml WBB. Dette ble inkubert i 2 timer på et rullebord (Roller mixer SRT9, Stuart) i romtemperatur.
9. Vasket 3 x 5 min i WBB.
10. 2nd antistoff konjugert til alkalisk phosphatase 1:2000 ble tilsatt i 5 ml WBB. Dette sto i 2 timer på rulle.
11. Vasket 3 x 5 min i WBB.
12. Vasket 1 x 5 min i fremkallingsbuffer.

13. Membranen ble overført til 20 ml fremkallingsvæske i et lite kar, til ønsket styrke av proteiner ble synlig på membranen.
14. Fremkallingen ble stoppet ved å overføre membranen til dH₂O. Membranen fikk ligge i ca. 5 min.

3.4.3 Coomassie

Denne metoden farger alle proteinene i SDS-PAGE.

Alt ble gjort på et rystebord/vippebord.

1. Gelen ble vasket i springvann i et lite kar i 3 x 5 minutter.
2. Vannet ble fjernet og 50 ml reagens (Bio-Safe™ Coomassie G-250 stain) ble tilsatt per gel. Dette fikk stå i 1 time.
3. Gelen ble rensset med vann i 30 min. Vannet ble skiftet hvert 10. minutt.
4. Gelen ble oppbevart i springvann.

Protokoll fra flasken Bio-Safe™ Coomassie G-250 stain.

3.5 Elektronmikroskopi (EM)

EM deles i to hovedgrupper: transmisjonselektronmikroskopi (TEM), hvor man kan se strukturer inni cellene, og scanningelektronmikroskopi (SEM), hvor man kan studere overflaten til prøven. I dette arbeidet ble det benyttet TEM som redskap for å studere bakteriene, fagene og interaksjonen dem i mellom (MolecularExpressions™).

Et elektronmikroskop benytter elektronstråling istedenfor lys når det belyser prøver.

Elektronene støter sammen med prøvens atomkjerner og får en spredning som detekteres og bildet dannes. Biologiske prøver består først og fremst av atomer med lave atomnumre (karbon, oksygen og hydrogen), og sannsynligheten for sammenstøt med elektronene er lavere enn for atomer med høyere atomnummer. For å øke sjansen for sammenstøt og dermed gi et mer kontrastfylt bilde, blir prøver ofte behandlet med tungmetaller. I denne oppgaven ble det brukt uranylacetat (uran, atomnr 92) som kan bindes til fosfater og nukleinsyrer. Avhengig av metoden som benyttes kan uranylacetat brukes i både positiv og negativ farging. Negativ farging innebærer at selve prøven forblir ufarget, mens bakgrunnen farges og ved positiv farging motsatt (MolecularExpressions™).

Et annet viktig punkt ved prøvebehandling er fiksering med for eksempel glutaraldehyd. Man ønsker å stabilisere cellene slik at man kan fjerne vann, og samtidig bevare cellene og cellekomponentenes størrelse og form. En buffer (PBS) kan bidra til å opprettholde pH- og osmotiske forhold under fiksering slik at det er minst mulige endringer i cellenes naturlige miljø når de stabiliseres (Griffiths et al., 1993).

3.5.1 Negativ farging av bakterier og bakteriofager for TEM

Protokoll:

1. Griddene ble lagt på en dråpe vann* i 1 min, for å fjerne negative ladninger på gridden som kan frastøte bakterier som er negativt ladet på overflaten.
 2. Griddene ble plassert på en dråpe materialløsning i 5 min.
 3. Vask med en dråpe PBS i totalt 1 minutt.
 4. Fiksert med 0,5% glutaraldehyd i 4 min.
 5. Vask med PBS. 3 dråper i totalt 3 min.
 6. Vask med vann. 4 dråper i totalt 3 min for å unngå saltrester som kan bli farget av uranylacetaten. Dette kan gi krystaller som dekker preparatet.
 7. Negativ farging med 4% uranylacetat i 1-2 minutter.
 8. Vask med vann. 1 dråpe i totalt 1-2 sekunder.
 9. Overflødig vann ble fjernet ved å berøre gridden forsiktig på Wattmann No. 1 filterpapir
- dH₂O og MQ-vann er blitt brukt om hverandre.
- Tiden inkluderer "rask" vask på 1-2 sekunder og klargjøring av neste punkt.

3.5.2 Immunogull-merking av fag

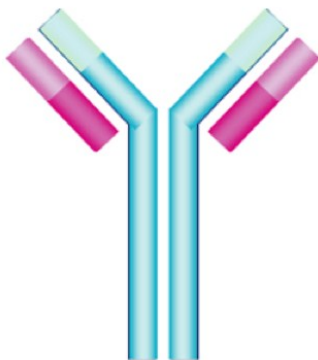
Ettersom strukturene av bakteriofager og pili er ganske like, ble det benyttet antistoff og gullmerking for å kunne skille dem fra hverandre. Kun bakteriofagene ble gullmerket i denne oppgaven.

Antistoff

Antistoffer eller immunoglobuliner (Ig) interagerer spesifikt med antigener. Antistoffene kan deles opp i fem hovedgrupper, IgG, IgA, IgM, IgD og IgE. Det mest vanligste og enkleste antistoffet, IgG, finnes i ekstracellulær væske og blod. Det er et Y-formet molekyl med to

bindingssteder som er lokalisert på enden av hver arm. Det er derfor bivalent fordi det kan binde to antigener (Madigan et al., 2009).

Hvert antistoff består av to lette kjeder og to tunge kjeder som sammen utgjør Y-en. Hver arm består av en lett og en tung kjede der de variable domeneene interagerer sammen, og danner en reseptor som kan binde et antigen (se figur 9). Bindingsaffiniteten angir hvor sterk en interaksjon mellom et antistoff og antigen er (Madigan et al., 2009).



Figur 9 Illustrasjon av IgG-antistoff. Blått viser delen av molekylet som har felles aminosyresekvenser for alle IgG. Mørk rosa - felles. Lys rosa og lys blå - varierer mellom antigenene, de variable domeneene som danner en reseptor og binder antigener. Blått og lys blå utgjør de tunge kjedene, mens rosa utgjør de lette kjedene. (Bilde hentet fra http://www.tootoo.com/show/pro_photo.php?pid=1427219).

Antigener er substanser som kan bindes av antistoffer. For at det skal være mulig å binde til et antistoff må det være en del av antigenet, en epitop, som spesifikt reagerer med/kjennes igjen av antistoffet (Madigan et al., 2009).

Antistoffer kan bli laget spesielt til proteiner man ønsker å identifisere dersom man vet hva antigenet er og kan rense det opp. Det er å mulig å lage to typer antistoff, polyklonal og monoklonal (Griffiths et al., 1993).

Produksjon av antistoffer

Polyklonale antistoffer

Antigenet injiseres i et passende dyr, som for eksempel mus, for å skape en immunrespons. Deretter gjentas dosen senere for å indusere frem sekundær respons (Griffiths et al., 1993) i antistoffproduksjonen. I den primære responsen dannes det mest IgM, mens det i den sekundære responsen (booster respons) dannes ti ganger så mye antistoffer og mest IgG (Madigan et al., 2009). Etter at sekundærresponsen er indusert kan antiserumet isoleres fra dyret (Griffiths et al., 1993).

Polyklonale antistoffer får man på grunn av at et antigen består av mange epitoper. Det dannes derfor flere ulike Iger mot hver av disse epitopene og man får en kompleks blanding med antistoffer. Polyklonale antistoffer kan være vanskelig å reprodusere ettersom det er en individuell respons for hvert enkelt dyr (Madigan et al., 2009).

Monoklonale antistoffer

En Ig dannes av en B-lymfocyt og man kan derfor benytte seg av en klon *in vitro* som kan produsere ubegrenset med antistoff som er monospesifikt. Disse antistoffene kalles for monoklonale. Cellene dør normalt etter noen uker i cellekultur og for å overkomme dette problemet er det blitt laget hybride cellelinjer av antistoff-produserende B-celler med tumorceller, myelomas, som har evnen til å dele seg ubegrenset. Cellene kalles for hybridomas og kan dyrkes videre i enten mus eller i cellekultur (Madigan et al., 2009). Slik som med produksjon av polyklonale antistoffer injiseres antigenet inn i mus. I løpet av noen uker dannes det antigen-spesifikke B-celler som produserer antistoffer i musen. Deretter fjernes vev (milt, lymfeknuter) som er rikt med B-celler, og B-cellene klones med myelomacellene (Madigan et al., 2009).

Antistoffet som ble benyttet i oppgaven hører til immunoglobulinklassen IgG_{2b} og bindes til en epitop på pVIII hos fagen (Progen biotechnik). pVIII er proteinet som dekker hele fagen (Micheel et al., 1994).

Protein A finnes naturlig i cellemembranen til de fleste *Staphylococcus aureus*. Det inneholder fem IgG-bindingsdomener, men kun to av dem er aktive. Antakelig fordi ved binding av to IgG-molekyler gir steriske hindringer slik at andre IgG-molekyler ikke kan binde seg. Det binder seg spesielt til Fc-domenene på IgG-molekyler fra mennesker, kanin/hare, gris

og marsvin. Protein A og gullet blir behandlet slik at de danner et kompleks (Griffiths et al., 1993). Protein A-gullet som ble brukt i denne oppgaven ble kjøpt ferdig fra produsenten, CMC University of Utrecht.

Protokoll:

1. Griddene ble vasket med PBS. 1 dråpe i totalt 1 min.
 2. Griddene ble lagt på 1 dråpe fagsuspensjon i 10 min.
 3. Vask på dråpe av PBS. 3 dråper, i totalt 3 minutter.
 4. Fiksering på 1 dråpe 0.1% glutaraldehyd i PBS i 4 min.
 5. Lagt på 1 dråpe 1% FSG (fish skin gelatine) i PBS i 5 min.
 6. Lagt på 1 dråpe anti-f-phage, fortynnet 1:500 i 1% FSG i 30 min.
 7. Vask med 1% FSG i PBS. 3 dråper i totalt 3 min.
 8. Vask med PBS. 4 dråper i totalt 3 min.
 9. Lagt på 1 dråpe 10 nm Protein A gull, fortynnet 1:70 i 1% FSG i PBS i 20 min.
 10. Vask med PBS. 3 dråper i totalt 3 min.
 11. Vask med vann. 3 dråper i totalt 3 min.
 12. Lagt 2 minutter på 1 dråpe 4% uranylacetat
 13. Vask med vann*
 14. Overflødig vann ble fjernet ved å berøre griddene forsiktig på et Wattman No. 1 filterpapir.
- *dH₂O og MQ-vann ble brukt om hverandre.
- Tiden inkluderer "rask" vask på 1-2 sekunder og klargjøring av neste punkt.

3.5.3 Visualisering av bakterie-fag-interaksjoner

For å studere interaksjonene mellom bakterier og fag ble det fulgt samme protokoll som ved transfeksjonsforsøk:

1. Bakteriene ble dyrket opp under pili-induserende forhold.
2. 75 µl bakteriekultur ble mikset med 75 µl fagsuspensjon (fd-dog eller fd-Δ).
3. Bakterie-fagsuspensjon ble lett rystet på et roterende hjul (Labinco B.V) i 20 minutter ved romtemperatur.

Deretter ble protokollen for immunogull-merking av fag fulgt. Dette ble gjennomført for *V. cholerae* TolA sammen med fd-dog og fd-Δ.

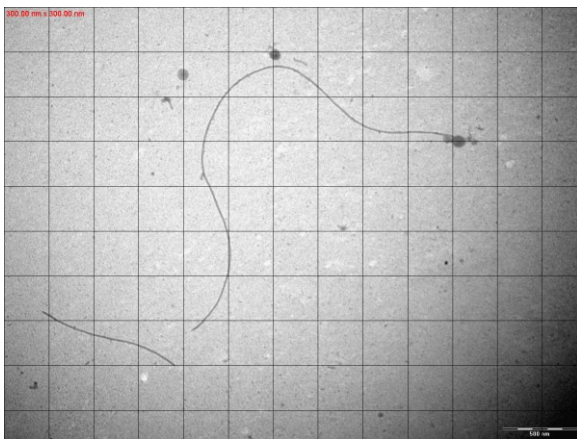
3.5.4 Måling av fagenes lengde

Fagene ble behandlet med negativ farging (protokoll – Negativ farging av bakterier og bakteriofager for TEM). Fagene ble tatt bilde av fortløpende uten seleksjon og det ble lagt på et gitter med en bestemt størrelse i elektronmikroskopet. I dette tilfellet 300 nm x 300 nm.

Formelen under (formel 1) viser hvordan lengden ble beregnet. Antall kryssninger sier hvor mange linjer fagen har passert. Dersom fagen passerte et kryss, ble det regnet som to kryssninger. Antall kryssninger på den lille fagen (figur 10) er fire, lengden vil derfor være 942 nm.

Formel 1 Formelen for å finne lengden til bakteriofagene.

$$Lengde = \frac{\pi}{4} \times \text{antall kryssninger} \times \text{diameter}$$



Figur 10 TEM av CTXφ. Eksempel på gitter der én rute er 300 nm x 300 nm. Scale bar viser 500 nm.

3.6 Statistiske analyser

Under arbeid med forsøk og særlig ved biologiske forsøk er det mange ting som kan spille inn. Dette kan være tekniske feil eller at bakterier og dyr ikke oppfører seg som de normalt ville. Dette kan gi resultater som avviker eller ikke-resultat, der man ikke får resultater av uforklarlige grunner. Personen som utfører forsøkene kan også foreta seg ting underveis i forsøkene ubevisst som også kan spille inn.

Ettersom det er mange mulige feilkilder som kan spille inn er det derfor viktig med statistiske analyser av resultatene for å se om ulike variasjoner er reelle eller ikke. I denne oppgaven ble det beregnet gjennomsnitt av minst tre utførte paralleller av forsøkene, og i tillegg standardavvik ved måling av faglengdene.

4 Resultater

Hovedmålsettingen i dette arbeidet er å studere struktur-funksjonsforholdet mellom T4P hos *V. cholerae* og dens interaksjoner med bakteriofagen CTXφ. Her er immunogull-TEM en nyttig analysemetode. Ettersom det ikke finnes gode antistoff som gjenkjenner CTXφ har hybridfagen fd-Δ blitt benyttet i tilsvarende analyser (Ford et al., 2012), men den spesifikke bindingen mellom pili og fag har vært vanskelig å tolke ettersom villtype *V. cholerae*-stammen O395 uttrykker TCP i bunter (Winther-Larsen og Waldor, upubliserte data). For å øke resolusjonen var det av interesse å benytte andre *V. cholerae tcpA*-mutanter som er kjent for uttrykk av enkel-pilus eller pili med non-agglutinerende morfologi.

4.1 Ekspresjon av TCP-pili i *Vibrio cholerae*

Det er kjent at uttrykk av TCP hos *V. cholerae* reguleres av membranproteinet ToxR som igjen lar seg stimulere av miljøet bakterien er i (Murley et al., 1999). Dette kan for eksempel være i human gastrointestinal trakt eller vannreservoarer. Det ble derfor i starten av arbeidet jobbet med å gjenskape optimale TCP-induserende vekstforhold på laboratoriet.

4.1.1 Etablering av TCP-induserende vekstforhold

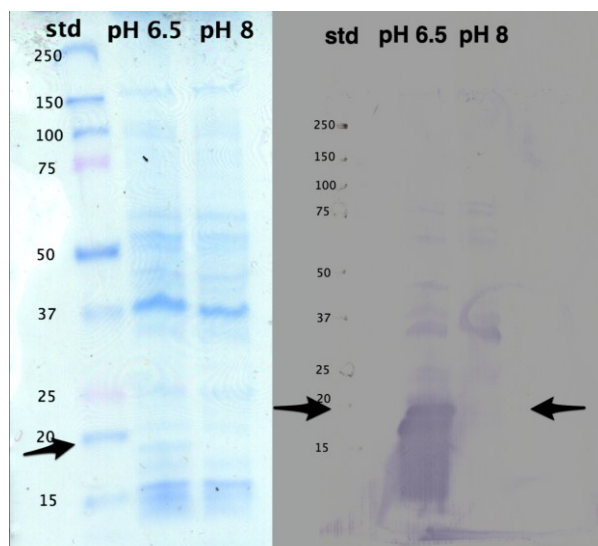
Tidligere studier har vist at det er krevende å gjenskape de optimale TCP-induserende vekstforholdene for *V. cholerae* (Franer, 2005). Ulike parametere ble testet og dette inkluderte svært små inokulum, temperatur, rystehastighet på inkubatorer og pH i vekstmediet. En god indikasjon på piliuttrykk hos villtypen *V. cholerae* O395 er agglutinerings. Agglutinerings kan sees makroskopisk i vekstkulturen hos *V. cholerae* (Lim et al., 2010) og dette ble derfor brukt som et første mål på gode TCP-induserende vekstforhold. Videre er transfeksjon av *V. cholerae* avhengig av TCP-ekspresjon. Transfeksjonsforsøk med CTXφ ble dermed benyttet som et mål på uttrykk av funksjonelle TCP-pili.

Inkubatorene som ble testet hadde horisontal rysting og en inkubator hadde et roterende hjul (lignende et pariserhjul) (Hiriom, Gran Boeckel). Inkubatorene som hadde horisontal rysting ble testet ved 40 rpm (C24 Incubator shaker, NBS) og 225 rpm (Innova™ 4200 Incubator shaker, NBS), mens det roterende hjulet roterte med 5 rpm. I forbindelse med testing av inkubatorene ble det også testet temperaturer ved 30°C og 37°C.

Inkubatoren som viste seg å gi best resultat i forhold til piliuttrykk og transfeksjonsevnen, var inkubatoren med rolig rotering ved hjelp av et hjul. Kraftig rysting ga ingen transfeksjon noe som kan ha sammenheng med at pili blant annet uttrykkes for at bakteriene skal kunne danne mikrokolonier (Lim et al., 2010), det vil derfor ikke være nødvendig å uttrykke pili-samling (resultater ikke vist). Ved høy rpm og ved 37°C ble det sett makroskopisk at kulturene hadde mye høyere tetthet enn ved rolig rotering med hjulet ved 5 rpm og 30°C. Dette tydet på at kraftig rysting og høy temperatur stimulerer til raskere vekst og at 30°C er det optimale for pili-uttrykk (resultater ikke vist). Dette sammenfaller også med studier som har vist at TcpA-uttrykket er høyere ved 30°C enn ved 37°C (DiRita et al., 2000).

Ved bruk av den makroskopiske metoden ble det observert agglutinerings hos O395, TolA, ML12, ML19, ML21, ML23 og ML24. TolA-mutanten agglutinerte likte bra som villtypen O395, mens de resterende agglutinerte relativt lite. Det er ikke blitt publisert agglutineringsforsøk på TolA tidligere. Ettersom TolA kun har mutasjon i TolA-reseptoren var det forventet at TolA uttrykker funksjonelle pili som agglutinerer i like stor grad som O395. Bakteriene feller ut på grunn av at pilene interagerer med hverandre. Dette kan sees som et hvitt bunnfall i bunnen av kulturen. Se figur 1A hos Lim et al. (2010) for bilde av agglutinerings.

Innflytelse av pH i vekstmediet ble testet ved å utføre immunoblott etter at *V. cholerae* O395 hadde blitt dyrket over natten i LB justert til pH 6.5 eller pH 8 (ved 30°C og i 16 timer). Resultatet i figur 11 viste at TcpA-ekspresjonen er mye høyere ved pH 6.5 enn pH 8. Dette stemmer overens med publisert litteratur hvor det står at autoagglutinerings kan bli induert ved pH 6.5 og 30°C (Kirn et al., 2000) hvilket betyr at TcpA blir uttrykt. Coomassiefarging av gelen ble også gjennomført og viser at samme proteinmengde ble påsatt i alle brønnene og at overføringen av proteinene til membranen er lik.



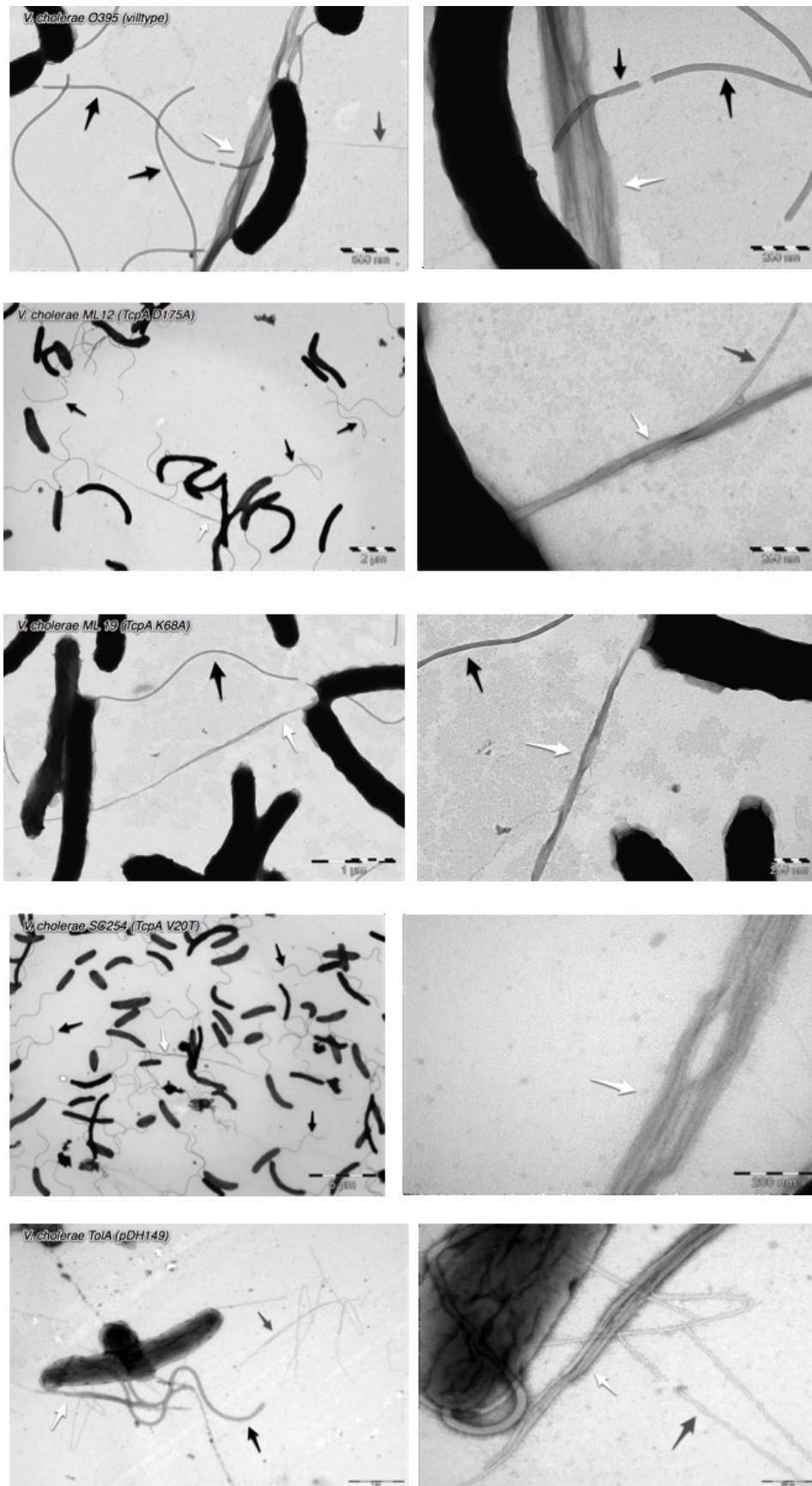
Figur 11 Immunoblott av TcpA-uttrykk hos *V. cholerae* med anti-TcpA spesifikt antistoff med hele cellelysats isolert etter vekst ved ulike pH. Bildet til venstre er coomassie-farget SDS-PAGE, mens det til høyre er immunoblottet. Første kolonne viser molekylvektstandarden med molekylvekt påført på siden i kD. Andre kolonne viser *V. cholerae* O395 dyrket opp i LB pH 6.5 og siste kolonne O395 dyrket opp i LB pH 8. Pilene viser området molekylvekten til TcpA befinner seg.

Selv ved identifiserte optimale vekstforhold ble ikke alltid agglutinerings observert i overnatt-kulturene. Dette var problematisk ettersom agglutinerings ble brukt som et mål på piliuttrykk før videre forsøk. For å undersøke dette nærmere ble det laget preparater til TEM som viste at det var god uttrykkelse av pili til tross for at kulturene ikke agglutinerte. Dette er også nevnt hos (Lim et al., 2010). Utfellingene i kulturene er dermed ikke en absolutt parameter for uttrykk av TCP.

4.1.2 Verifisering av TCP-uttrykk i *V. cholerae* og *V. cholerae* mutanter med TEM

Selv om TCP-uttrykk i *V. cholerae* i de fleste tilfeller forårsaker en agglutinerings-effekt, kan de under visse forhold og i enkelte av *V. cholerae* mutantene benyttet i denne oppgaven uttrykke TCP uten å agglutinere. Det var derfor av interesse å se nærmere på mutantene i TEM. Figur 12 viser O395 og mutantene som ble sett på i TEM, og som uttrykker pili og var detekterbare. På bildene ser man pili-bunter av ulik størrelse og strukturene til pilus. De viser også hvordan pili er assosiert med bakterien.

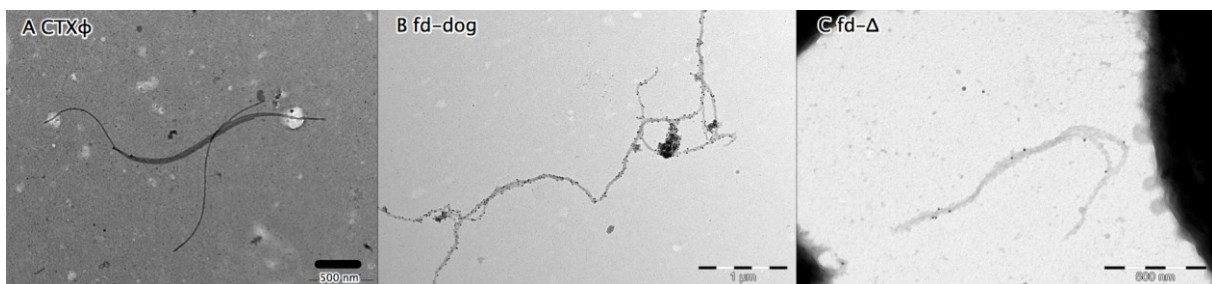
Det ble observert at O395 har tykkere pilibunter enn mutantene, samtidig som O395 også hadde mye pilus som ikke var bundet til bakterie eller andre pilus. O395 så ut til å uttrykke lengre pili enn mutantene, men dette ble ikke målt. SC254 uttrykte pilibunter som skilte seg ut fra både O395 og de andre mutantene ved at de var mer bølgete enn rette. Piliene i buntene så ikke ut til å være bundet tett til hverandre slik som hos O395, da det ofte ble observert at pilibuntene hos SC254 sprikte fra hverandre i den ene enden. ML12, ML19 og TolA har til felles at de uttrykker pilibunter som er mye tynnere og kortere enn O395. Det ble også observert en del løse pilus hos ML19 og TolA.



Figur 12 TEM av *V. cholerae* O395 (villtype), og TcpA-mutanter. Den hvite pila i bildene til venstre viser hvilket område som er forstørret i det høyre bildet og på TCP-pilubunter. Svart pil peker på flageller. Grå pil peker på TCP-pilus.

4.1.3 Fagisolering, TEM og lengdemåling på CTX ϕ , fd-dog og fd- Δ .

Etter fagisolering fra *V. cholerae* O395lacI pCTX ϕ kmR, *E. coli* DH5 α pir fd-DOG og *E. coli* DH5 α pir fd Δ 1_pIII^{CTX} (15-274), ble henholdsvis CTX ϕ , fd- Δ , og fd-dog benyttet i dette forsøket, visualisert ved bruk av TEM. Det ble ikke funnet noen strukturelle ulikheter mellom fagene ved TEM-analysen. Bildene av fd-dog og fd- Δ er merket med 10 nm protein A gull, dette kan imidlertid få dem til å se ruglete ut (figur 13). TEM-analysen gav inntrykk av at fd- Δ var lengre enn fd-dog.



Figur 13 Negativ farging av fagene i TEM. A) CTX ϕ B) fd-dog merket med 10 nm protein A gull C) fd- Δ er merket med 10 nm protein A. Alle bildene viser flere fag som ser ut til å være bundet til hverandre.

Lengden ble analysert ved å ta bilder av fagene fortløpende uten seleksjon. Lengden på de ulike fagene ble målt og fd- Δ viste seg å være over 10% lengre enn CTX ϕ og fd-dog (tabell 11).

Tabell 11 Lengden til bakteriofagene målt ved TEM-bildeanalyse. Lengden viser gjennomsnittet av minst 50 fag.

Bakteriofag	Lengde i nm	Standardavvik	95 % konfidensintervall
CTX	1262	584	(1112, 1399)
fd-dog	1201	311	(1121, 1280)
fd- Δ	1390	526	(1247, 1532)

Standardavviket måler spredningen fra gjennomsnittet og resultatene viser at de er relativt høye. Konfidensintervallet sier at gjennomsnittet med 95% sikkerhet i det intervallet.

4.2 Transfeksjon av *V. cholerae* og *V. cholerae*-mutanter med CTX ϕ , fd-dog og fd- Δ

4.2.1 Etablering og verifisering av transfeksjonsforsøk

Før transfeksjonsforsøk på *V. cholerae*-mutantene ble villtype *V. cholerae* O395 og *E. coli* TG1 f1+ transfektert med CTX ϕ , fd-dog og fd- Δ . Dette ble gjort for å vise at forsøkene som vist i publisert litteratur, kunne repeteres. Forsøkene ble gjennomført ved å inkubere bakteriestammene og fagene sammen for deretter å lage fortynningsrekker og plate dem ut på selektivt medie.

E. coli TG1 F1+ viser transfeksjonsfrekvens på 0.258 med fd-dog, mens med fd- Δ kunne ingen transfeksjon detekteres. Samtidig viser resultatene at *V. cholerae* kan bli infisert av fd- Δ , men ikke fd-dog. Dette var som forventet og i henhold til publisert arbeid av Heilpern og Waldor (2003). Resultatene av dette (tabell 12) viste at forsøkene var reproducerbare på laboratoriet her.

Tabell 12 Transfeksjonsfrekvensen for *E. coli* TG1 f1+ og *V. cholerae* O395 med fd-dog og fd- Δ . Frekvensen viser gjennomsnittet av minst tre forsøk. ID – ikke detekterbart i dette forsøket.

Art/bakterie	fd-dog	fd- Δ
<i>Vibrio cholerae</i>	ID	6.2×10^{-3}
<i>Escherichia coli</i> TG1 f1+	0.258	ID

4.2.2 fd- Δ transfeksjon av *V. cholerae* *tcpA*-mutanter

For å verifisere at fd- Δ er en god modell for bindingsstudier av CTX ϕ til *V. cholerae* *tcpA*-mutanter var det ønskelig å se på transfeksjonsfrekvensen til fd- Δ sammenlignet med CTX ϕ . Om fd- Δ transfekterer *tcpA*-mutantene i samme som grad som CTX ϕ , kan dette indikere at fd- Δ er en god modell. Alle *V. cholerae*-mutantene ble transfektert med CTX ϕ , fd-dog og fd- Δ (tabell 13).

Tabell 13 Transduksjonfrekvensen til mutantene av *V. cholerae* O395 med fagene. Frekvensen viser gjennomsnittet av minst tre forsøk. ID – ikke detekterbart i dette forsøket.

<i>Vibrio cholerae</i>	CTX	fd-dog	fd-Δ
O395	1.6×10^{-3}	ID	6.2×10^{-3}
ML12	9.5×10^{-4}	ID	1.9×10^{-3}
ML19	3.0×10^{-5}	ID	2.0×10^{-3}
ML21	ID	ID	ID
ML23	1.2×10^{-3}	ID	1.1×10^{-3}
ML24	8.7×10^{-4}	ID	3.1×10^{-4}
TolA	$< 1.0 \times 10^{-6}$	ID	ID
Tcp2	ID	ID	ID
Tcp2,TolA	ID	ID	ID
RT4015	7.9×10^{-5}	ID	6.9×10^{-6}
RT4016	ID	ID	ID
RT4017	1.9×10^{-3}	ID	2.7×10^{-3}
SC254	5.6×10^{-4}	ID	2.4×10^{-4}

Oppsettet på forsøket er satt opp slik at man ikke kan detektere transfeksjonsfrekvenser lavere enn 1×10^{-6} .

Transfeksjonsforsøkene ble gjennomført med villtypen *V. cholerae* O395 og mutantene parallelt med villtype O395 som en internkontroll. Transfeksjon med CTXφ og fd-dog er publisert for enkelte *V. cholerae*-mutanter i litteraturen. Disse er ML19, ML21, ML23, ML24, Tcp2, TolA, Tcp2,TolA (dobbelmutanten), RT4015, RT4016, RT4017, og SC254. Resultatene til ML21, TolA, Tcp2,TolA (dobbelmutanten), RT4016 og SC254 viste tilsvarende transfeksjonsfrekvens som vist hos Li et al. (2008), Kirn et al. (2000), og Heilpern og Waldor (2000). Den beste transfeksjonsfrekvensen med CTXφ ser man hos ML23 (TcpA E83R) og RT4017 (TcpA E158L) hvor frekvensen er tilsvarende O395. Dette var uventet ettersom det er vist hos henholdsvis Li et al. (2000) og Heilpern og Waldor (2000) at disse lar seg infisere i mindre grad enn villtype *V. cholerae* O395.

Resultatene viser videre at transfeksjonsfrekvensen for de fleste mutantene endrer seg fra CTXφ til fd-Δ. Resultatene av infeksjoner med fd-Δ er bedre enn CTXφ hos O395 og ML19, mens den er dårligere for RT4015 og SC254.

Når det gjelder TolA-mutantene, som har en transfeksjonsfrekvens på $< 1.0 \times 10^{-6}$ for CTX ϕ transfeksjon, hadde hver parallell kun 1-2 kolonier på platene. Dette er meget lave estimater, men resultatene ble likevel dokumentert som $< 1.0 \times 10^{-6}$. Tcp2 og Tcp2,TolA-dobbelmutanten lot seg ikke infisere av verken CTX ϕ eller fd- Δ i dette arbeidet, til tross for at Tcp2 er vist å kunne la seg infisere hos Heilpern og Waldor (2000).

4.2.3 Transfeksjon i *V. cholerae* C6706 og C6706luxO

I forhold til villtype O395 gav tcpA-mutanten ML19 en to-faktor økning i transfeksjonsfrekvens for fd- Δ i forhold til CTX ϕ . ML19 har en mutasjon i aminosyre 68 fra lysin (Lys, K) til alanin (Ala, A). Denne aminosyren utgjør også en forskjell i TcpA aminosyresekvensen hos *V. cholerae* klassisk biotype O395 og El Tor C6706 (Lim et al., 2010) (se figur 7). Det var derfor av interesse å sammenligne transfeksjonsfrekvensen for CTX ϕ og fd- Δ i disse to *V. cholerae* biotypene. Videre hadde vi tilgjengelig i laboratoriet stammen C6706 som er mutert i luxO-genet. LuxO er involvert i quorum-sensing hos *V. cholerae* C6706 som regulerer transkripsjon av en rekke virulensfaktorer (Vaitkevicius et al., 2006). Denne stammen ble inkludert i analysen. Som vi ser fra tabell 14 viser både C6706 og C6706luxO med lav transfeksjonsfrekvens for både CTX ϕ og fd- Δ .

Tabell 14 Transfeksjonsfrekvensen av CTX ϕ , fd-dog og fd- Δ i *V. cholerae* El Tor C6706, og mutanten C6706luxO.

<i>Vibrio cholerae</i>	CTX ϕ	fd-dog	fd- Δ
O395	1.6×10^{-3}	ID	6.2×10^{-3}
C6706	$< 1.0 \times 10^{-6}$	ID	$< 1.0 \times 10^{-6}$
C6706luxO	2.3×10^{-6}	ID	$< 1.0 \times 10^{-6}$

Ved fd- Δ infeksjon hos villtype C6706 og C6706luxO hadde kun en av tre paralleller infeksjonsfrekvens og på den ene parallellen var det én koloni. Dette er også veldig lave estimater, men ble likevel dokumentert som $< 1.0 \times 10^{-6}$.

4.2.4 Uttrykk av TcpA i *V. cholerae* tcpA-mutanter som uttrykker ToxT-regulatoren fra en IPTG-induserbar promotor

V. cholerae-stammene som inneholder pM5T-plasmidet lar seg indusere til å øke uttrykket av ToxT. ToxT er transkripsjonsaktivatoren som aktiverer uttrykk av TcpA (Murley et al., 1999). *V. cholerae*-stammen som ble inkludert i dette forsøket var:

LC12 (TcpA, A156D/E158A/K172A/D175N),

LC13 (TcpA, A138E/A156D/E158A/K172A/D175N),

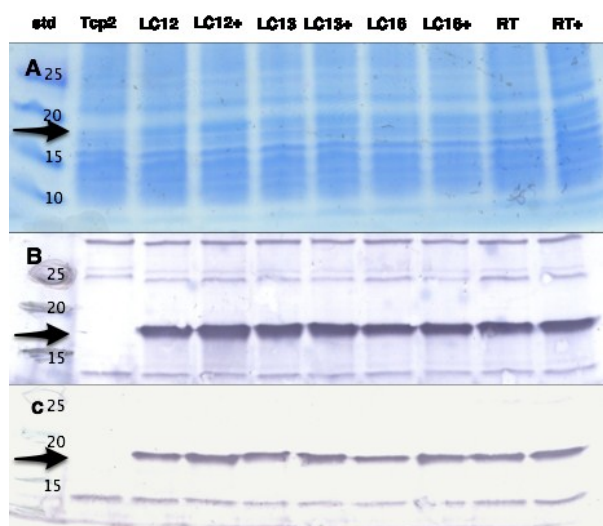
LC16 (TcpA, A138E/A156D/E158A/K172A/D175N/K187T) og RT4224 (TcpA H181A).

For å kontrollere om det faktisk blir uttrykt mer TcpA ved IPTG-induksjon, ble det gjennomført immunoblott for å detektere TcpA-nivået. Mutantene ble dyrket opp under pili-induserende forhold med og uten IPTG parallelt, og prøvene ble preparert samtidig. Som negativ kontroll ble *tcpA*-delesjonsmutanten Tcp2 inkludert.

Ettersom tidligere immunoblott på PVDF-membran viste utflytende overføring av TcpA ved deteksjon med anti-TcpA antistoff ble det benyttet både PVDF- og nitrocellulosemembran for å se hvilke av membranene som fungerte best i dette forsøket. PVDF-membranen har god overføring av proteinene, men det kan være vanskelig å se tydelig om mengde TcpA uttrykt ble økt. Fra immunoblottet (figur 14B) med PVDF-membranen ser det ut til at LC12 får høyere ekspresjon av TcpA ved induksjon av ToxT, mens dette er vanskelig å detektere for de andre mutantene.

Nitrocellulosemembranen gir også god overføring av proteinene, men i motsetning til PVDF-membranen kan man her tydeligere se forskjeller i ekspresjonen av TcpA (figur 14C). I likhet med PVDF-membranen ser man også her at TcpA øker hos LC12 med IPTG. Samtidig ser man også en økning hos LC13 og LC16 med IPTG. Som forventet viser delesjonsmutanten av *tcp*, Tcp2, ingen ekspresjon av TcpA.

Etter blottingen av proteiner over på membranen ble gelen farget med coomassie for å se at overføringen av proteinene gikk som det skulle (Figur 14A). Gelen viser at det er mye proteiner igjen, men det viser også at overføringen er lik for alle prøvene.



Figur 14 Immunoblott av *V. cholerae tcpA*-mutanter med og uten induksjon av ToxT. A) Coomassie farging av SDS-PAGE gelen etter overføringen av proteinene B) Immunoblott med PVDF-membran. C) Immunoblot med nitrocellulose-membran. Std; standard, + indusert med IPTG, RT; RT4225. Pilene indikerer hvor molekyllvekten til TcpA befinner seg.

For å se om oppreguleringen av ToxT og uttrykket av TcpA kan spille en rolle for fagenes infeksjonsevne ble det også gjennomført transfeksjonsforsøk på disse mutantene. De ble dyrket opp under pili-induserende forhold med og uten IPTG parallelt (tabell 15).

Tabell 15 Transfeksjonsfrekvensen til mutantene av *V. cholerae* O395 med pMT5toxT med og uten tilsatt IPTG med CTXφ, fd-dog og fd-Δ. Frekvensen viser gjennomsnittet av minst tre forsøk. ID – ikke detekterbart i dette forsøket.

<i>Vibrio cholerae</i>	CTXφ	fd-dog	fd-Δ
O395	1.6×10^{-3}	ID	6.2×10^{-3}
LC12	1.6×10^{-3}	ID	3.7×10^{-5}
LC12*	6.3×10^{-3}	ID	2.3×10^{-3}
LC13	1.6×10^{-4}	ID	1.8×10^{-5}
LC13*	1.2×10^{-3}	ID	3.4×10^{-4}
LC16	7.4×10^{-4}	ID	1.4×10^{-3}
LC16*	9.8×10^{-4}	ID	2.4×10^{-3}
RT4225	9.7×10^{-5}	ID	2.1×10^{-4}
RT4225*	3.8×10^{-3}	ID	2.1×10^{-4}
*indusert med 1mM IPTG			

Ser man kun på hver enkelt mutant med og uten tilsetning av IPTG, viser resultatene at det gir en økning i transfeksjonsfrekvensen ved induksjon av ToxT. Dette kan tyde på at uttrykkelsen av TCP har økt.

LC12-mutanten viser to faktorer lavere transfeksjonsfrekvens fra CTXφ til fd-Δ, samtidig som LC12* viser nesten like god frekvens som O395 hos begge fagene. RT4225 viser derimot en veldig dårlig frekvens med CTXφ, men om blir bedre enn O395 ved indusering med IPTG.

Kort oppsummert viser tabellen at induseringen med IPTG ser ut til å øke transfeksjonsevnen til begge fagene hos alle mutantene. Dette kan sees i sammenheng med immunoblottene som viste økt uttrykkelse av TcpA. Samtidig er det individuelle forskjeller på om transfeksjonsfrekvensen øker fra CTXφ til fd-Δ.

LC-stammene inneholder klassisk-til-El Tor-mutasjoner. Dette betyr at aminosyrene som befinner seg hos den klassiske biotypen, er byttet ut med aminosyren som befinner seg på nøyaktig samme lokasjon hos El Tor-biotypen (se figur 7). El Tor-biotypen av *V. cholerae*

uttrykker som kjent TCP som kryssbinder, i motsetning til den klassiske O395 som uttrykker bunter. På grunn av El Tor-mutasjonene er det vist at LC-stammene uttrykker TCP som kryssbinder i tillegg til bunter (Lim et al., 2010). ML12 deler også en klassisk-til-El Tor-mutasjon med LC-stammene. Fra aspartatsyre 175 til asparagin, men i motsetning til LC-stammene uttrykker ML12 kun bunter (Lim et al., 2010). Dette tyder på at aminosyre 175 ikke spiller en rolle i TCP-morfologien. Det var derfor også interessant å se om dette kunne spille inn på transfeksjonsevnen til fagene. Resultatene viser at uttrykkelsen av kryssbindinger kan påvirke fag-infeksjon.

4.2.5 *V. cholerae* og TolA-C

Gruppen til Lisa Craig ved Simon Fraser Universitetet, Canada har vært interessert i å analysere rollen til *V. cholerae* TolA i CTXφs infeksjon. I den sammenheng var det også av interesse å se på interaksjonen ved tilsatt opprenset C-terminal del av TolA-reseptoren i transfeksjon med CTXφ og fd-Δ. Hos Ff-fagene er det foreslått at de først binder seg til F-pili via N2-domenet for deretter å eksponere bindingssetet sitt for TolA i N1. Slik kan N1 binde seg til det C-terminale domenet av TolA (Lubkowski et al., 1999). En hypotese er at CTXφ benytter lignende mekanisme for å infisere *V. cholerae* (Ford et al., 2012).

Resultatene her viser at C-terminaldomenet av TolA hemmer transfeksjonsfrekvensen i villtype O395, for både CTXφ og fd-Δ (tabell 16, vedlegg 3)

Tabell 16 Inhibering av fagtransfeksjon med TolA-C av *V. cholerae* O395. Frekvensen viser gjennomsnittet av minst tre forsøk.

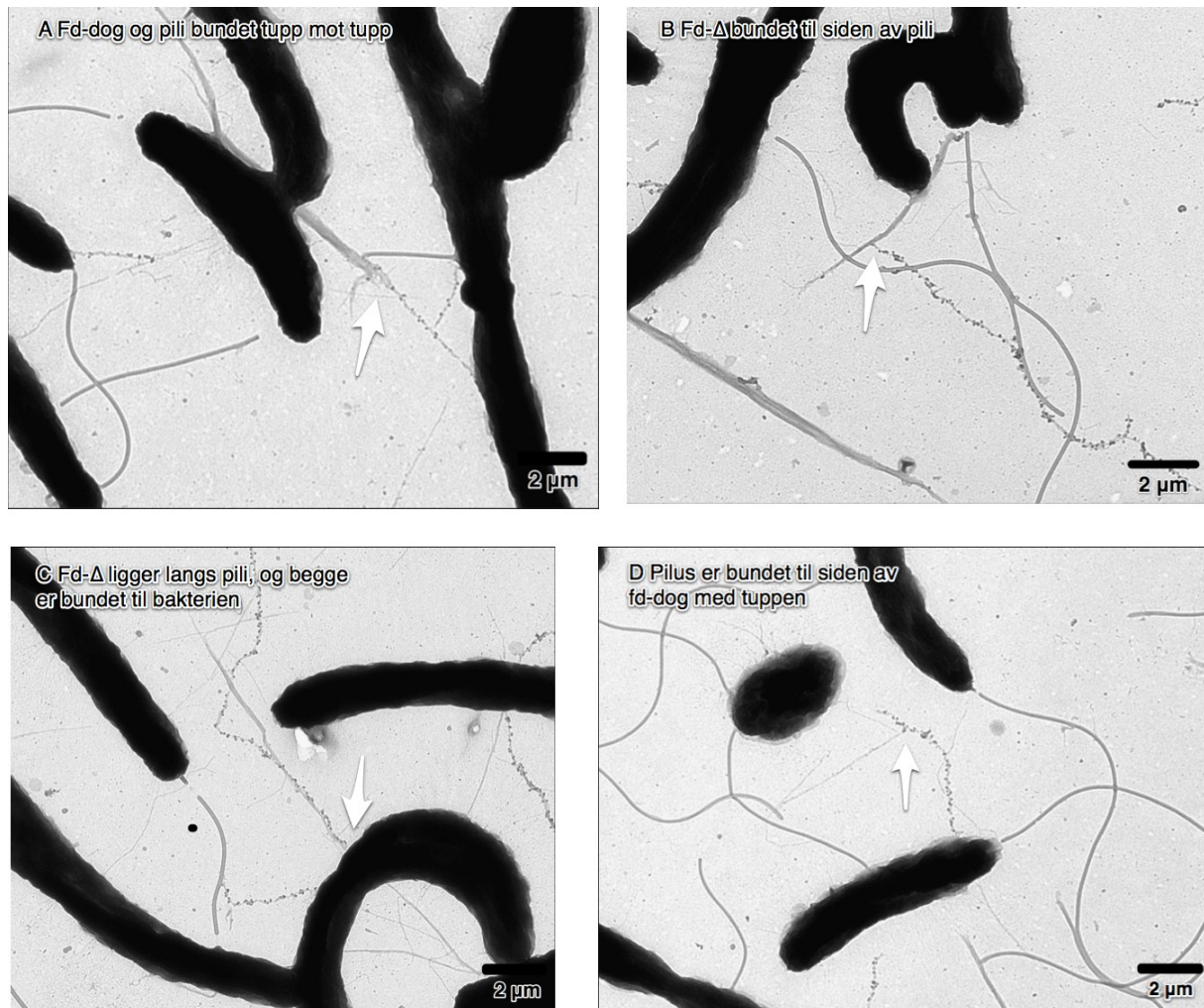
<i>Vibrio cholerae</i> O395	CTXφ	fd-Δ
m/buffer	1.1×10^{-3}	2.2×10^{-3}
m/TolA-C 3.8 mM	4.0×10^{-4}	4.1×10^{-4}

4.3 Interaksjoner mellom fd-fag og *V. cholerae*

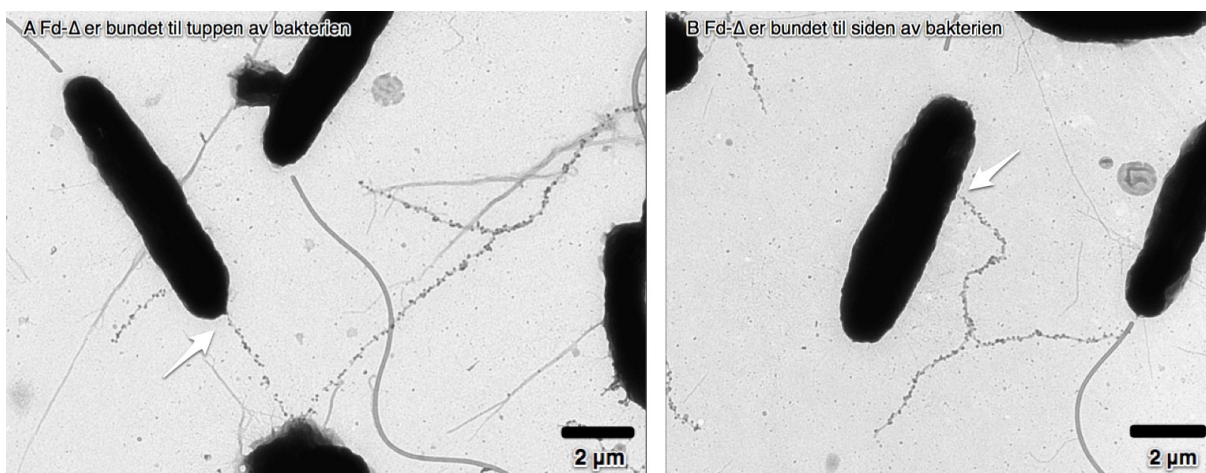
4.3.1 Immunogull TEM av fd-fag i *V. cholerae* TolA

For å visualisere hvordan fd-dog og fd-Δ binder seg til bakteriene ble det benyttet immunogull-TEM som analysemetode. På grunn av den like strukturen hos TCP og fagene ble fd-dog og fd-Δ merket med gull for å skille dem fra TCP-pili. fd-dog ble også inkludert i denne metoden som en kontroll. Det ble observert fem ulike interaksjoner hos begge fagene (figur 15 og 16):

1. Fag bundet direkte til bakterien, både på siden og på tuppen av bakterien.
2. Pili og fag bundet til hverandre tupp mot tupp.
3. Fag bundet med tuppen til siden av pili.
4. Fag som ligger langs pili, mens begge er bundet til bakterien.
5. Pili som er bundet med tuppen til siden av en fag.



Figur 15 Immunogull TEM av fd-dog og fd-Δ hos *V. cholerae* TolA. A) Fd-dog og pili er bundet til hverandre tupp mot tupp. B) Fd-Δ er bundet med tuppen til siden av en pili. C) Fd-Δ ligger langs en pili og begge er bundet til bakterien. D) Pili er bundet til siden av fd-dog med tuppen. Fagene er merket med 10 nm protein A gull koblet til anti-pVIII antistoff.



Figur 16 Immunogull TEM av fd-dog og fd-Δ hos *V. cholerae* TolA. A) Fd-Δ er bundet til tuppen av bakterien. B) Fd-Δ er bundet til siden av bakterien. Fagene er merket med 10 nm protein A gull koblet til anti-pVIII antistoff.

Prosentvis antall fd-dog eller fd-Δ som interagerer med bakteriene eller pili er oppsummert i tabell 17. For reelle tall se vedlegg 4.

Tabell 17 Oversikt over bakteriofagene fd-dog og fd-Δs interaksjoner med *V. cholerae* TolA. Prosenten viser av totalt antall talte bakterier.

<i>V. cholerae</i> TolA	fd-dog	fd-Δ
Antall bakterier som interagerer med fag	30 %	68 %
Fagen er bundet til siden av bakterien	20 %	34 %
Fagen er bundet til tuppen av bakterien	19 %	12 %
Fagen er bundet til siden av pili	6 %	8 %
Fag og bakterie er bundet tupp mot tupp	0.7 %	4 %
Pili er bundet til siden av fagen	1 %	9 %

Resultatene viser at det er en større prosentandel med fd-Δ enn fd-dog som har en interaksjon med bakteriene. 30 % av talte bakterier hadde en interaksjon (både direkte med bakterien og med pili) med fd-dog, mens det var hele 68 % som hadde en interaksjon med fd-Δ. Totalt var det 46 % av fd-Δ som var bundet til fagen direkte og 39 % hos fd-dog. Dette kan tyde på at fd-dog kan interagere med *V. cholerae* TolA til tross for at den ikke kan infisere bakterien, men at interaksjonene er stimulert ved uttrykk av pIII^{CTX} i hybridfagen.

5 Diskusjon

5.1 Etablering av pili-induserende forhold

Som et ledd i etableringen av en imaging-metode for å studere struktur-funksjonsmekanismene mellom CTX ϕ og TCP-pili, ble det i begynnelsen av arbeidet testet ut ulike vekstforhold for best uttrykk av TCP-pili hos *V. cholerae*. Som indikator for piliuttrykk ble det først benyttet en makroskopisk agglutineringsmetode. Videre ble transfeksjonsforsøk med CTX ϕ -fag benyttet for så å verifisere funksjonell TCP-ekspresjon. Til slutt ble TCP observert ved TEM. Vekstforholdene som ble funnet mest optimalt, var 30°C rolig blanding på et roterende hjul med 5 rpm (Hiriom, Gran Boeckel). Ved høy rpm og 37°C (Innova™ 4200, Incubator shaker, NBS) ble det sett makroskopisk at kulturene hadde mye høyere tetthet, ingen agglutinerings og ingen detekterbar transfeksjon. Dette tydet på at kraftig rysting og høy temperatur stimulerer til raskere vekst og at det ikke blir uttrykket funksjonelle pili. Studiene gjort her viste at det ikke alltid er en sterk korrelasjon mellom agglutinerings og TCP-uttrykk ettersom det i enkelte tilfeller var synlige pili i TEM uten sterk makroskopisk klumpingseffekt. Det ble ikke funnet noe direkte sammenheng for disse observasjonene, men resultatene indikerer at det er verdt å gjøre imaging-forsøk selv om det ikke blir observert sterk klumping.

Ved vekst med ulik pH ble det dokumentert en stor effekt på *tcpA*-ekspresjon. Dette ble vist med immunoblott-analysen der *V. cholerae* O395 ble dyrket opp over natt i LB med pH 6.5 og pH 8. Resultatet her viste at *TcpA*-uttrykket er høyest ved pH 6.5. Dette sammenfaller som beskrevet at pH påvirker TCP-uttrykk kraftig (Behari et al., 2001).

For uttrykk av pili hos *E. coli* ble *E. coli* TG1 f1+ også dyrket under pili-induserende forhold. fd-dog transfekterte *E. coli* TG1 f1+, mens fd- Δ viste ingen evne til å infisere *E. coli*. Dette var som forventet og i henhold til publisert arbeid av Heilpern og Waldor (2003). Kort oppsummert så viser disse transfeksjonsforsøkene at resultatene kjent fra litteraturen var reproduserbare på laboratoriet her.

5.2 fd-Δ som CTXφ-TCP struktur-funksjonsmodell

Før dette arbeidet startet var det allerede kjent at CTXφ infiserer enkelte av *V. cholerae* mutantene dårligere enn villtypen. Dette gjelder spesielt Tcp2 ($\Delta tcpA$) og Tcp2,TolA ($\Delta tcpA, tolA$) (dobbelmutanten), men også for aminosyresubstitusjonene i TcpA. Noen av aminosyrene spiller en større rolle enn andre, som er tydeligst hos ML21 (TcpA R26E) og RT4016 (TcpA D149A). Aminosyresubstitusjoner i TcpA kan endre morfologien til piliene slik at bakteriofagenes bindingsmuligheter forandres, og det er varierende hvordan TCP kommer til uttrykk hos mutantene. Det er kjent at mutantene kan uttrykke enkle pilus, pilibunter, korte, bølgede og rette pili.

SC254 har en substitusjon i aminosyre 20 fra valin til treonin og RT4017 har substitusjon i aminosyre 158 fra glutamatsyre til leucin. Disse mutantene uttrykker henholdsvis bølgede og bøyd pili som er bundet sammen. Studier viser at transfeksjonsfrekvensen med CTXφ til disse to mutantene går betraktelig ned (Kirn et al., 2000) og det ble også vist i denne oppgaven. Den lave frekvensen kan indikere på at interaksjonen med CTXφ og fd-Δ er svekket på grunn av morfologien til piliene. Hittil er det ikke funnet mutanter som lar seg infisere av fag bedre enn villtype O395.

Størrelse på pilibuntene kan også variere slik at disse forskjellene i piliuttrykk kan spille en rolle for faginfeksjon. Resultatene viser at RT4015 som har en mutasjon i aminosyre 146 fra aspartatsyre til alanin har en lav transfeksjonsfrekvens med CTXφ og fd-Δ. RT4016 (D149A) som har mutasjon i aminosyre 149 fra aspartatsyre til alanin, lot seg ikke infisere av verken CTXφ eller fd-Δ. Studier gjort av Kirn et al. (2000) viser tilsvarende frekvens hos begge mutantene og de viser også at RT4015 uttrykker færre pili og små bunter, mens RT4016 uttrykker få pilus og ingen pilibunter. På grunnlag av disse to mutantene kan det se ut som pilibunter er avgjørende for effektiv transfeksjon, men samtidig må det også tas i betraktning at de uttrykker færre pili, noe som også kan være en påvirkende faktor (færre primærespetorer).

Evnen til å selvagglutinere varierer også mellom mutantene, slik at det kan ha en innvirkning på faginteraksjoner. Ser man nærmere på ML19 med mutasjon i aminosyre 68 fra lysin til alanin, viser litteraturen at ML19 både agglutinerer og blir transfektert en faktor dårligere (Li et al., 2008). Studien viser videre at ML23 (E83R) og ML24 (R26E,E83R) viser samme tendens.

Det kan derfor se ut som om det er en sammenheng mellom agglutinerings og transfeksjon ettersom de alle uttrykker pili-bunter og derfor har et likt grunnlag for sammenligning.

Det er heller ikke kjent hvordan CTX ϕ og TCP finner frem til hverandre eller hvordan CTX ϕ finner frem til TolA-bindingssitet. Det er nevnt at bakterien kan bruke flagellen til kjemotakse slik at det kan være mulig at bakterien benytter dette til å finne frem til området der fagen er.

Ved mutasjoner i både *tolA* og *tcpA* vil fagen som nevnt i litteraturen, ikke kunne infisere bakteriene (Heilpern and Waldor, 2000). Dette er også vist her med Tcp2, TolA (dobbelmutanten). Begge bindingssitetene til fagene er berørt siden både evnen til å uttrykke pili er borte og TolA-reseptoren er fjernet.

Ved mutasjoner i kun *tolA* fjernes ikke fagens evne til å infisere *V. cholerae* helt, men transfeksjonsfrekvensen er veldig lav. *V. cholerae* TolA-mutanten uttrykker funksjonelle TCP, slik at TCP og fag kan interagere og ved en eventuell piliretraksjon ta med seg fagen til celleoverflaten. Selv om reseptoren er mutert så kan fagen fremdeles binde seg til bakterien via TCP og penetrere cellemembranen til en viss grad. En hypotese kan være at hos villtypen vil begge bindingssitetene, TCP og TolQRA, sammen danne en ny reseptor som gir en konformasjonsendring eller et signal som slipper fag gjennom cellemembranen. Ved delesjon i TolA ser det likevel ut til at konformasjonsendringen er mulig å danne til et viss punkt, ettersom TolQR, som også er reseptorproteiner (Heilpern and Waldor, 2000) fortsatt er tilstede. Hos *V. cholerae* Tcp2, der all Tcp-pili-ekspressjon er fjernet vil det ikke være mulig å danne en ny reseptor ettersom kun TolQRA-reseptorproteinene er tilstede. Dette kommer til uttrykk som manglende transduksjon med CTX ϕ .

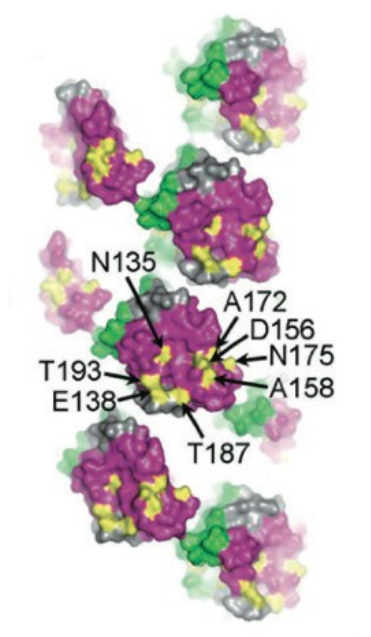
I denne oppgaven var det ingen detekterbare kolonier i forsøkene med Tcp2 (tabell 13). I publisert arbeid er det blitt vist at Tcp2 lar seg infisere av fd- Δ (Heilpern and Waldor, 2003), og i en annen studie er det vist Tcp2 ikke lar seg infisere med CTX ϕ (Waldor and Mekalanos, 1996). En årsak til avviket fra litteraturen når det gjelder infeksjon med fd- Δ kan være at utplatingen av antall celler i forsøket kan ha vært for liten til å kunne detektere eventuelle transformerte celler. Hver fortytning i transfeksjonsforsøket ble platet ut med kun 5 μ l, men dersom det ble gjort en god nok miksing før uttak fra fortytningen bør dette være et godt nok representativt uttak. Det ble også gjort tre paralleller av hver mutant noe som også bør

kunne gi et representativt resultat. Transfeksjonsfrekvensen for fd- Δ av Tcp2 vist hos Heilpern og Waldor (2003) er likevel veldig lav, slik at man kan si at resultatene vist i denne oppgaven samsvarer med litteraturen. TCP ser derfor ut til å spille en viktig rolle for fagenes evne til å infisere.

Kun hos TolA-mutanten hadde fd- Δ redusert infeksjonsevnen i forhold til CTX ϕ , men her er det viktig å merke seg at transfeksjonsevnen hos CTX ϕ var på grensen til hva som er mulig å detektere i dette forsøket. Videre viser forsøkene med de ulike *tcpA*-mutantene også at det er veldig varierende transfeksjonsfrekvens med CTX ϕ . Enkelte aminosyrer kan gi konformasjonsendringer som kan forårsake ulik bakteriofagbinding til TCP.

Konformasjonsendringene kan involvere aminosyrer som normalt er eksponert og er viktig for fagbinding, kan bli skjult. Enkelte av aminosyrene i C-terminalen, i posisjon 120-186 (-187), er de som normalt er eksponert i TCP-filamentet, men det ser ut til at det er uklarheter om hvor avgrensingen av hvilke aminosyrer som er eksponert går (Kirn et al., 2000; Li et al., 2008). Aminosyrene i posisjon 120-186 (-187), befinner seg i den såkalte D-regionen og er involvert i pilus-interaksjoner (Craig et al., 2004) (figur 17). Mutantene som har aminosubstitusjoner i dette området, er ML12 (D175N), RT4015 (D146A), RT4016 (D149A), RT4017 (E158L), LC12 (TcpA, A156D/E158A/K172A/D175N), LC13 (TcpA, A138E/A156D/E158A/K172A/D175N), LC16 (TcpA, A138E/A156D/E158A/K172A/D175N/K187T) og RT4224 (TcpA H181A).

Mutantene som har markant lavere transfeksjonsfrekvens med CTX ϕ enn villtype O395, er RT4015 med mutasjon i aminosyre 146 fra aspartatsyre til alanin, RT4016 med mutasjon i aminosyre 149 fra aspartatsyre til alanin, RT4225 med mutasjon i aminosyre 181 fra histidin til alanin og LC13 med mutasjon i aminosyrene i den såkalte D-regionen (Lim et al., 2010). Resultatene til transfeksjonsfrekvensen tyder på at mutasjonene i disse mutantene kan være involvert i en konformasjonsendring der bindingssetet til CTX ϕ blir mindre tilgjengelig eller at de selv er viktig for binding med fag. Resultatene fra transfeksjonsforsøket med RT4016 med CTX ϕ var ikke detekterbart og det indikerer at mutasjonen i aminosyre 149 spiller en viktig rolle i transduksjon med fag. Ser man videre på RT4015 viser denne mutanten veldig lav frekvens, og mutasjonen i aminosyre 146 er nærliggende til mutasjonen til aminosyre 149 hos RT4016. Dette kan tyde på at dette området har stor betydning for transduksjon.



Figur 17 Illustrasjon av El Tor TCP som viser området hvor aminosyrene (120-186) er eksponert, ligger (lilla). Noen av aminosyrene er markert med gult. Aβ-loopen er merket grønn (Lim et al., 2010).

Ingen av *tcpA*-mutantene som er totalt defekte for CTX ϕ -transduksjon, lot seg infisere av fd- Δ . Dette kan tyde på at pVIII-proteinet, som utgjør kappen langs fd-fagen, ikke spiller en rolle i infeksjonen av *V. cholerae*. Det er tydelig at pIII bindingsproteinet utgjør den viktigste faktoren.

V. cholerae C6706 villtype El Tor viste veldig lav transeksjonsfrekvens. Resultatene var uventet ettersom det er kjent at El Tor-stammene kan gi koleraepidemier (Folkehelseinstituttet, 2010). Dette kan komme av at den uttrykker en annen type TCP enn *V. cholerae* O395. Som vist hos Lim et al. (2010) uttrykker C6706 kryssbindinger i TCP. Dette betyr at piliene interagerer med hverandre ved å danne et slags rutenett i motsetning til O395 der de interagerer med hverandre på langs og kan danne bunter med pili. Ut ifra resultatene kan det se ut som om hvordan TCP kommer til uttrykk hos bakteriene spiller en rolle for transduksjonen. Kryssbindinger mellom enkelt-pilus kan kanskje dekke de spesifikke bindingsepitopene til fagen, men resultatene kan også bety at de optimale forholdene for å uttrykke funksjonelle pili som kan binde seg til CTX ϕ ikke er avdekket.

Ekspresjon av mange kjente virulensfaktorer er regulert i *V. cholerae* via quorum sensing (QS) systemer. LuxO er en negativ regulator i QS-systemet som påvirker ekspresjon av TCP assosierte proteiner. Det har blant annet vist seg at både CT (koleratoksinet) og TcpA-produksjon er sterkt nedregulert i en *V. cholerae* C6706 *luxO* mutant (Zhu et al., 2002). Dette kommer til uttrykk i den lave transduksjonsfrekvensen observert for både CTX ϕ og fd- Δ .

Signifikansen av disse resultatene er likevel vanskelig å diskutere i denne sammenhengen siden foreldrestammen C6706 uttrykker enda høyere resistens til både CTX ϕ og fd- Δ .

Oppsummerer man resultatene ser det ut til at fd- Δ transfekterer tcpA-mutantene i samme grad som CTX ϕ , og at den derfor er en god modell for bindingsstudier av CTX ϕ til *V. cholerae*-mutantene.

5.2.1 Overuttrykk av ToxT med implikasjoner for transfeksjon hos *V. cholerae*-mutanter

LC12, LC13, LC16 og RT5224 mutantene inneholder et plasmid som ved IPTG-induksjon overuttrykker ToxT. Immunoblott-analysen viser at overuttrykk av ToxT øker TcpA-produksjonen hos disse *V. cholerae*-mutantene. Videre øker transfeksjonsfrekvensen med både CTX ϕ og fd- Δ for hver enkelt mutant der noen har større økning enn andre. Dette kan tyde på at produksjonen av TcpA har økt og dermed også muligens uttrykk av TCP. Økt TCP-ekspressjon kan ha bidratt slik at flere fag ble bundet. Alternativt kan økt TCP uttrykk på bakterienes overflate forandre konformasjon til pili, som igjen promoterer binding av fag. Det foreligger ingen resultater som tilsier at uttrykket av TCP har økt, og dette har heller ikke blitt studert tidligere. Det som er kjent, er at økt ekspressjon av tcpA har effekt på overflateuttrykk av TCP ved for eksempel forandring i pH. TEM er ingen egnet metode for kvantifisering av pili, og det hadde derfor vært interessant å utføre en piliekstraksjon for å se om piliuttrykket faktisk øker.

LC-stammene har i tillegg til plasmidet, en rekke El Tor-mutasjoner som påvirker TCP ved å endre morfologien. Ved siden av å uttrykke pilibunter, uttrykker de også kryssbindinger der pilus interagerer med hverandre og danner et slags rutenett. Lim et al. (2010) viste at *V. cholerae* ML15 (som ikke er inkludert i denne oppgaven), som kun har en mutasjon fra alanine 156 til aspartatsyre, kan uttrykke pili som kan danne kryssbindinger i tillegg til bunter. Denne mutasjonen deler den med LC-stammene, noe som tyder på at mutasjonen er en av flere mulige årsaker til at LC-stammene kan uttrykke pili som danner kryssbindinger. Ettersom både LC12, LC13 og LC16 uttrykker kryssbindende pili så kan dette ha en innvirkning på transduksjonsfrekvensen, slik som hos *V. cholerae* C6706. I motsetning til C6706, så uttrykker LC-stammene også TCP-bunter (Lim et al., 2010). Det er derfor usikkert om dette påvirker transfeksjonsfrekvensen i like stor grad hos alle.

Ser man på hver enkelt mutant så øker transfeksjonsfrekvensen hos begge fagene med induksjon av ToxT. LC12 skiller seg ut med nedgang på nesten to faktorer i frekvensen når det blir infisert av fd- Δ i forhold til CTX ϕ , mens i LC12* er dette forholdet sterkt redusert. Immunoblottet for LC12 viser at ved indusering med IPTG så øker TcpA-uttrykket hos LC12*. Hvis forskjellene skyldes en økning i TCP-uttrykk så kan det tenkes at dette har bidratt til høyere transduksjonsfrekvens hos LC12* enn LC12. Så selv om fd- Δ ikke binder seg like godt hos LC12 TCP, vil en eventuell økning i ekspresjon av pili kunne kompensere for dette og bidra til binding og infeksjon av flere fag.

LC16 og LC16* viser ingen stor forskjell i transfeksjonsfrekvensen hos verken CTX ϕ eller fd- Δ med og uten induksjon av ToxT, men immunoblottet med nitrocellulosemembranen viser at det er en tydelig økning i ekspresjon av TcpA. Mulige alternativer kan være at uttrykk av TCP ikke øker, eller at uttrykkelsen av TCP øker, men mer av kryssbindinger enn bunter. Som vist hos C6706 med kryssbindende pili kan dette være et bidrag til hemming av transfeksjonen. Det er ikke vist her hvilken morfologi og struktur TCP har i disse mutantene. Det hadde vært interessant å undersøke dette nærmere ved TEM. En mulig hypotese kan være at kryssbindende TCP lar seg lettere indusere, men dette er ikke kjent fra litteraturen.

Hos LC13 og RT4225 viser transfeksjonsresultatene at CTX ϕ infiserer bakteriene i større grad ved indusering med IPTG. Som nevnt tidligere har LC13 og RT4225 mutasjoner i aminosyrer som normalt er eksponert i TCP-filamentet (se figur 17). Disse aminosyresubstitusjonene kan gi eventuelle konformasjonsendringer som kan bidra med å hemme infeksjon av CTX ϕ . Ved indusering av ToxT ser det ut til at denne hemmingen kan reverseres. Denne reverseringen kan indikere på at en eventuell konformasjonsendring ikke har stor betydning hos LC13, men at det er hvilken type TCP som blir uttrykt som spiller inn, kryssbindende pili eller pilibunter. Immunoblottet med nitrocellulosemembranen viser at det er økning i TcpA-uttrykk hos både LC13 og RT4225. Det er videre kjent at RT4225 uttrykker pilibunter som villtype O395 (Kirn et al., 2000), og dette tyder på at økning i TcpA-ekspresjon (og antakelig TCP-ekspresjon) kan øke tranfeksjonseffektiviteten. Det kan også indikere på at en eventuell TCP-ekspresjon er mer effektiv hos RT4225 enn LC13.

LC13 (TcpA A138E/A156D/E158A/K172A/D175N) og LC16 (TcpA A138E/A156D/E158A/K172A/D175N/K187T) har fem like mutasjoner i *tcpA*, men i tillegg har

LC16 aminosyren treonin i posisjon 187 istedenfor lysin. Transfeksjonsfrekvensen er tydelig høyere for LC16 og LC16* enn LC13 og LC16*. Det kan derfor tenkes at denne ekstra mutasjonen favoriserer binding til fd- Δ ved at bindingssetet for eksempel er mer tilgjengelig for fd- Δ . Aminosyren treonin har molekylvekt 101.11 (MW), mens lysin har MW 128.17. Ettersom treonin er mindre enn lysin kan dette bidra til at molekylstrukturen trekkes mer sammen i området til posisjon 187 og dermed eksponerer aminosyrer andre steder som fremmer binding med fag.

Generelt sett kan en annen mulig årsak til at transfeksjonsfrekvensen varierer være at det var blitt tilsatt et ulikt antall infeksjøs bakteriofager til kulturene. Det ble under arbeidet laget flere batcher med fagløsninger som ikke ble standardisert. I stedet ble det valgt å benytte transfeksjon av villtypen O395 i alle forsøkene som en internkontroll. Imidlertid ble det observert under TEM-analysen at fag-batcher som hadde blitt lagret over lengre tid, hadde en tendens til å agglutinere. Dette kan også eventuelt ha påvirket transduksjonsfrekvensen i noen av forsøkene ved at fagene var bundet til hverandre og ikke tilgjengelig for binding til TCP.

5.2.2 *V. cholerae* O395 og interaksjoner med TolA-C

Ved tilstedeværelse av opprenset C-terminal del (D3) av TolA-reseptoren viser transfeksjonsresultatene at dette minker frekvensen hos både CTX ϕ og fd- Δ . Dette indikerer at CTX ϕ og fd- Δ kan binde seg til proteinet TolA-C i suspensjonen, og fagene vil være mindre tilgjengelige for interaksjon med både TCP og TolA-reseptoren på bakterien. Dette kan tyde på at fagene kan binde seg til TolA uten at det er bundet til TCP-pili. I motsetning til Ff-fagene som må være koblet til F-pili for å kunne eksponere bindingssetet for TolA, så tyder resultatene også på at bindingssetet for TolA på CTX ϕ og fd- Δ er tilgjengelig uavhengig av binding til TCP (Ford et al., 2012).

Det hadde vært interessant å se om det er mulig å hemme CTX ϕ s infeksjonsevne av *V. cholerae* totalt med høy nok konsentrasjon av TolA-C tilstede. Dersom det er mulig hadde det vært spennende å følge dette videre og se om det er mulig å utvikle et middel for å forhindre koleraepidemier i situasjoner man vet har en tendens til å eskalere seg.

5.2.3 Visualisering av bakterie-fag-interaksjonene

CTXφs interaksjon med *V. cholerae* sammenlignes med fds interaksjon med F-pili hos *E. coli* hvor fd-fagen bindes til F-pili tupp mot tupp, ettersom det er kjent at CTXφ trenger de samme komponentene, TolQRA og pili, som Fd-fagen trenger for å infisere *E. coli* effektivt. Det er derfor en teori om at CTXφ også må binde seg til TCP-pili, tupp mot tupp for å kunne infisere *V. cholerae*. Denne interaksjonen ble overraskende lite observert, men det ble observert en del som var koblet direkte til bakterien. Det kan derfor tenkes at en eventuell piliretraksjon har skjedd etter binding til fagen og at man derfor ikke ser pili, men kun fagen som er koblet til bakterien.

Det ble observert fag som lå langs en pili samtidig som begge var bundet til bakterien og at fagen var bundet med tuppen til siden av en pili. En mulighet kan være at fagen først har bundet seg til siden av pili og deretter blitt trukket med pilien til overflaten av bakterien. Det vil derfor være naturlig å gå videre med studier som ser på pili-retraksjon over tid etter fag-interaksjoner. På den måten ville man forhåpentligvis kunne se fag-interaksjonene på et tidligere tidspunkt og kunne trekke en klarere konklusjon.

Det ble observert at flere pili var bundet med tuppen til siden på fagene. Det er ikke blitt beskrevet om TCP har adhesin eller hvor det eventuelt skal befinne seg, men fagenes adhesin befinner seg på tuppen av fagen. Når bildene viser at pilituppen er bundet langs fagen kan det være en teori at tuppen til pili er generelt klebrig og kan binde fag.

Ut ifra bildeanalysene ser det ut som fd-dog kan binde seg til TCP og bakterien til tross for at fagen ikke kan infisere *V. cholerae*. Transfeksjonsresultatene samsvarer også med data vist tidligere av Heilpern og Waldor (2003). Det kan også tenkes at dersom TcpA er glykosylert så kan dette være noe fd-dog kan kjenne igjen og dermed binde seg til TCP. Det er også en større prosentandel med fd-Δ enn fd-dog som er bundet til pili og bakterie. Det tyder på at pIII^{CTX} har mer spesifikk binding til bakterien.

Forsøkene ble gjort i en *V. cholerae* TolA-delesjonsmutant hvor det kun er igjen TolQR-reseptorproteiner. Det er vist at TolA ikke er nødvendig for at CTXφ skal kunne binde seg til bakterien, men det er viktig for opptak av fagen (Ford et al., 2012). Observasjonene av fag- og bakterieinteraksjoner indikerer kun at fd-Δ fremdeles har evnen til å binde seg til TCP og bakterien, men ikke om fagen blir tatt opp i bakterien. Det hadde derfor vært interessant å

utføre det samme forsøket med TCP-delesjonsmutanten, *Tcp2*, og se hvordan fag- og bakterieinteraksjonene er der.

5.2.4 Lengden til fagene

Fra målingsanalysen ble det vist at hybridene *fd-Δ* er over 10% lengre enn CTXφ og *fd-dog*, mens de faktiske dataene viser at *fd-dog* og *fd-Δ* ser ut å være jevnt over like lange og at lengdene på CTXφ-fagene varierer veldig. Standardavvikene for fagene er relativt høye og ved nærmere undersøkelse av de faktiske data viser det seg at alle fagene har uteliggere som kan bidra til å øke standardavviket. Det er likevel valgt å inkludere dem ettersom det er reelle observasjoner, men samtidig så kan det være vanskelig å stole på dataene når standardavvikene er så høye.

Det er kjent at fagelengdene påvirkes av lengden på genmateriale. Det er derfor ved kloning av *OrfU/pIII* hos CTXφ inn i *fd-dog* forventet at hybridene *fd-Δ* er lengre enn *fd-dog*.

Fagkappen vil også dermed bli lengre. Det kan også tenkes at enkelte uteliggere egentlig er to fag som ligger etter hverandre, men som kan være vanskelig å detektere i TEM.

6 Forslag til videre arbeid

Forslag til videre arbeid er å se nærmere på fag- og bakterieinteraksjonene. Dette kan for eksempel være et transfeksjonsforsøk med tidsintervall i TEM. Ettersom inkuberingen av bakteriene foregår i 20 minutter, så kan fag-bakterie-suspensjonene tas ut etter 5, 10, 15, og 20 minutter for deretter å lage preparater til TEM. Da ville man forhåpentligvis kunne se når fagen binder seg til TCP eller bakterie, og når den tas opp i bakterien. En annen mulighet er live imaging, hvor det er mulig å følge interaksjonen mellom bakterien og fagen til enhver tid.

Det er også mulig å gullmerke kun TCP, slik at man kan jobbe med CTX ϕ og ikke hybridene fd- Δ . Da får man også vist direkte hva slags interaksjoner det er mellom bakterien, TCP og CTX ϕ istedenfor indirekte via fd- Δ . Det kan da være mest hensiktsmessig å velge en mutant som ikke uttrykker mye bunter, da det kan være lettere å se hvor fagen binder seg når man kun har en enkel pilus å forholde seg til. Det kan også være mye antistoff og gull som dekker TCP, slik at det derfor også kan være lettere å se hvor fagen binder seg med en enkel pilus.

For en del av de ulike mutantene ble det bare gjennomført immunoblott for å se på *tcpA*-uttrykket. Det ville derfor vært interessant å ha gjort en piliekstraksjon for å se om TcpA-ekspresjonen samsvarer med TCP-uttrykket på overflaten av bakteriene.

Til slutt, men ikke minst, hadde det vært interessant å gjøre en krystallstrukturanalyse av *tcpA*-mutantene og TcpA-CTX ϕ -bindinger. Det ville vært et godt verktøy for å få et klarere bilde av hvordan pili interagerer med bakteriofager.

7 Referanser

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2004). Essential Cell Biology. Abingdon, UK, Garland Science.
- AlQasimTrust (2012). Bacteriophage life cycle, Al Qasim Trust.
- Behari, J., Stagon, L. and Calderwood, S. B. (2001). *pepA*, a gene mediating pH regulation of virulence genes in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology* 183(1): 178-188.
- Calia, K. E., Murtagh, M., Ferraro, M. J. and Calderwood, S. B. (1994). Comparison of *Vibrio cholerae* O139 with *V. cholerae* O1 classical and El Tor biotypes. *Infection and immunity* 62(4): 1504-1506.
- Campos, J. M., Geisselsoder, J. and Zusman, D. R. (1978). Isolation of bacteriophage MX4, a generalized transducing phage for *Myxococcus xanthus*. *Journal of molecular biology* 119(2): 167.
- Casjens, S. R., Gilcrease, E. B., Winn-Stapley, D. A., Schicklmaier, P., Schmieger, H., Pedulla, M. L., Ford, M. E., Houtz, J. M., Hatfull, G. F. and Hendrix, R. W. (2005). The generalized transducing *Salmonella* bacteriophage ES18: complete genome sequence and DNA packaging strategy. *Journal of bacteriology* 187(3): 1091-1104.
- Craig, L. and Li, J. (2008). Type IV pili: paradoxes in form and function. *Current opinion in structural biology* 18(2): 267-277.
- Craig, L., Pique, M. E. and Tainer, J. A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 2(5): 363-378.
- Craig, L., Taylor, R. K., Pique, M. E., Adair, B. D., Arvai, A. S., Singh, M., Lloyd, S. J., Shin, D. S., Getzoff, E. D. and Yeager, M. (2003). Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin. *Molecular cell* 11(5): 1139-1150.
- Dabbs, E. R. (1987). A generalised transducing bacteriophage for *Rhodococcus erythropolis*. *Molecular and General Genetics MGG* 206(1): 116-120.
- Davis, B. M. and Waldor, M. K. (2003). Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Current opinion in microbiology* 6(1): 35-42.
- De Boer, H. A., Comstock, L. J. and Vasser, M. (1983). The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80(1): 21.
- DiRita, V. J., Engleberg, N. C., Heath, A., Miller, A., Crawford, J. A. and Yu, R. (2000). Virulence gene regulation inside and outside. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355(1397): 657-665.
- DiRita, V. J., Neely, M., Taylor, R. K. and Bruss, P. M. (1996). Differential expression of the *ToxR* regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype-specific control over *toxT* expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(15): 7991.
- Duchrow, M. and Giffhorn, F. (1987). Physical map of the *Rhodobacter sphaeroides* bacteriophage phi RsG1 genome and location of the prophage on the host chromosome. *Journal of bacteriology* 169(9): 4410-4414.
- Faruque, S. M., Albert, M. J. and Mekalanos, J. J. (1998). Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and molecular biology reviews* 62(4): 1301-1314.
- Folkehelseinstituttet. (03.08.2012). Difteri. Hentet 3. september, 2012, fra http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_6039&MainArea_566_1=6039:0:15,5078:1:0:0::0:0&MainLeft_6039=6041:82707::1:6043:30::0:0.
- Folkehelseinstituttet. (2010, 25.02.2010). Kolera. Hentet 8. september, 2012.
- Ford, C. G., Kolappan, S., Phan, H. T. H., Winther-Larsen, H. C. and Craig, L. (2012). Crystal Structures of CTXφ pIII Unbound and in Complex with *Vibrio cholerae* TolA Reveal Novel Interaction Interfaces. *Journal of Biological Chemistry*.

- Franer, K. (2005). Establishment of a microscopical assay to study the structure-function relationship between the bacteriophage CTX ϕ with *Vibrio cholerae* type IV pili. Veterinær Master, Norges veterinærhøgskole.
- Gallagher, S. R. (2007). One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins.
- Griffiths, G., Burke, B. and Lucocq, J. (1993). Fine structure immunocytochemistry, Springer-Verlag Berlin:.
- Heilpern, A. J. and Waldor, M. K. (2000). CTX ϕ infection of *Vibrio cholerae* requires the tolQRA gene products. *Journal of bacteriology* 182(6): 1739-1747.
- Heilpern, A. J. and Waldor, M. K. (2003). pIIICTX, a predicted CTX ϕ minor coat protein, can expand the host range of coliphage fd to include *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology* 185(3): 1037-1044.
- Herrington, D. A., Hall, R. H., Losonsky, G., Mekalanos, J. J., Taylor, R. and Levine, M. M. (1988). Toxin, toxin-coregulated pili, and the toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *The Journal of experimental medicine* 168(4): 1487.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P. and Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research* 19(15): 4133-4137.
- Kaufman, M. R. and Taylor, R. K. (1994). The Toxin-Coregulated Pilus: Biogenesis and Function. 187-202.
- Kirn, T. J., Lafferty, M. J., Sandoe, C. M. P. and Taylor, R. K. (2000). Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology* 35(4): 896-910.
- Legemiddelhåndboka. (20.06.2010). Hentet 28.08.2012, 2012, fra <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/36889>
- Legemiddelhåndboka. (20.06.2010). Hentet 28. august, 2012, fra <http://legemiddelhandboka.no/Terapi/s%C3%B8ker/kolera/915>.
- Li, J., Lim, M. S., Li, S., Brock, M., Pique, M. E., Woods Jr, V. L. and Craig, L. (2008). *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Structure* 16(1): 137-148.
- Lim, M. S., Ng, D., Zong, Z. S., Arvai, A. S., Taylor, R. K., Tainer, J. A. and Craig, L. (2010). *Vibrio cholerae* El Tor TcpA crystal structure and mechanism for pilus - mediated microcolony formation. *Molecular microbiology* 77(3): 755-770.
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. and Wlodawer, A. (1998). The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of g3p. *Nature Structural & Molecular Biology* 5(2): 140-147.
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. and Wlodawer, A. (1999). Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure* 7(6): 711-722.
- Madigan, M. T. M., John M, Dunlap, P. V. and Clark, D. P. (2009). Brock Biology of Microorganisms. San Francisco, CA, USA, Pearson Benjamin Cummings.
- Mathur, J. and Waldor, M. K. (2004). The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity* 72(6): 3577-3583.
- McLeod, S. M., Kimsey, H. H., Davis, B. M. and Waldor, M. K. (2005). CTX ϕ and *Vibrio cholerae*: exploring a newly recognized type of phage-host cell relationship. *Molecular microbiology* 57(2): 347-356.
- Micheel, B., Heymann, S., Scharte, G., Böttger, V., Vogel, F., Dübel, S., Breitling, F., Little, M. and Behrsing, O. (1994). Production of monoclonal antibodies against epitopes of the main coat protein of filamentous fd phages. *Journal of immunological methods* 171(1): 103-109.
- MolecularExpressions™. Exploring the World of Optics and Microscopy. Hentet august, 2012, fra <http://microscopy.fsu.edu>.

- Murley, Y. M., Carroll, P. A., Skorupski, K., Taylor, R. K. and Calderwood, S. B. (1999). Differential Transcription of the tcpPHOperon Confers Biotype-Specific Control of the *Vibrio cholerae* ToxR Virulence Regulon. *Infection and immunity* 67(10): 5117-5123.
- Ottemann, K. M. and Mekalanos, J. J. (1994). Regulation of Cholera Toxin Expression. 177-185.
- Pelacic, V. (2008). Type IV pili: e pluribus unum? *Molecular microbiology* 68(4): 827-837.
- Proft, T. and Baker, E. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria—structure, assembly and their role in disease. *Cellular and molecular life sciences* 66(4): 613-635.
- Riechmann, L. and Holliger, P. (1997). The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell* 90(2): 351-360.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schuhmacher, D. A. and Klose, K. E. (1999). Environmental signals modulate ToxT-dependent virulence factor expression in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology* 181(5): 1508-1514.
- Soothill, J. (1992). Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *Journal of medical microbiology* 37(4): 258-261.
- Sun, D., Mekalanos, J. J. and Taylor, R. K. (1990). Antibodies directed against the toxin-coregulated pilus isolated from *Vibrio cholerae* provide protection in the infant mouse experimental cholera model. *Journal of Infectious Diseases* 161(6): 1231-1236.
- Tacket, C. O., Taylor, R. K., Losonsky, G., Lim, Y., Nataro, J. P., Kaper, J. B. and Levine, M. M. (1998). Investigation of the roles of toxin-coregulated pili and mannose-sensitive hemagglutinin pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection. *Infection and immunity* 66(2): 692-695.
- Taylor, R. K., Miller, V. L., Furlong, D. B. and Mekalanos, J. J. (1987). Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(9): 2833.
- Ursitti, A. J., Mozdazanowski, J. and Speicher, D. W. (1995). Current Protocols in Protein Science.
- Vaitkevicius, K., Lindmark, B., Ou, G., Song, T., Toma, C., Iwanaga, M., Zhu, J., Andersson, A., Hammarström, M. L. and Tuck, S. (2006). A *Vibrio cholerae* protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator grazing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(24): 9280-9285.
- Waldor, M. K. and Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272(5270): 1910-1914.
- Wilke, D. (1980). Conjugational gene transfer in *Xanthobacter autotrophicus* GZ29. *Journal of General Microbiology* 117(2): 431-436.
- Wilson, B. A., Salyers, A. A., Whitt, D. D. and Winkler, M. E. (2011). Bacterial Pathogenesis - A Molecular Approach Washington, DC, American Society for Microbiology.
- WorldHealthOrganization. (Juli 2012). Cholera. Hentet 13. august, 2012, fra <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>.
- Zacher 3rd, A., Stock, C. A., Golden 2nd, J. and Smith, G. P. (1980). A new filamentous phage cloning vector: fd-tet. *Gene* 9(1-2): 127.
- Zhu, J., Miller, M. B., Vance, R. E., Dziejman, M., Bassler, B. L. and Mekalanos, J. J. (2002). Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Science's STKE* 99(5): 3129.

8 Vedlegg

1. Aminosyrene og forkortelser
2. BupH™ Tris-HEPES-SDS Running Buffer
3. Artikkel: Crystal Structure of CTX ϕ pIII Unbound and in Complex with *Vibrio cholerae* TolA reveal Novel Interaction Interfaces
4. Reelle tall på bakterie-fag interaksjoner

Korreksjon til masteroppgave

Struktur-funksjonsforhold mellom bakteriofagen CTX ϕ og *Vibrio cholerae* type IV pili

Hanh Hieu Thi Phan

Tabell 13 side 45. Rettet opp *V. cholerae* ML19 under transfeksjon med CTX ϕ .

<i>Vibrio cholerae</i>	CTX ϕ	fd-dog	fd- Δ
O395	1.6×10^{-3}	ID	6.2×10^{-3}
ML12	9.5×10^{-4}	ID	1.9×10^{-3}
ML19	3.0×10^{-3}	ID	2.0×10^{-3}
ML21	ID	ID	ID
ML23	1.2×10^{-3}	ID	1.1×10^{-3}
ML24	8.7×10^{-4}	ID	3.1×10^{-4}
TolA	$< 1.0 \times 10^{-6}$	ID	ID
Tcp2	ID	ID	ID
Tcp2,TolA	ID	ID	ID
RT4015	7.9×10^{-5}	ID	6.9×10^{-6}
RT4016	ID	ID	ID
RT4017	1.9×10^{-3}	ID	2.7×10^{-3}
SC254	5.6×10^{-4}	ID	2.4×10^{-4}

Tabell 17 side 52. Rettet opp prosentangivelse under fd-dog og en skrivefeil i den femte raden.

<i>V. cholerae</i> TolA	fd-dog	fd-Δ
Antall bakterier som interagerer med fag	30 %	68 %
Fagen er bundet til siden av bakterien	20 %	34 %
Fagen er bundet til tuppen av bakterien	6 %	12 %
Fagen er bundet til siden av pili	2 %	8 %
Fag og pili er bundet tupp mot tupp	1 %	4 %
Pili er bundet med tuppen til siden av fagen	1 %	9 %

Vedlegg 4. Hele tabellen er rettet opp ettersom tallene hadde blitt omroket.

<i>V. cholerae</i> TolA	fd-dog	fd-Δ
Totalt antall talte bakterier	297	190
Antall bakterier som interagerer med fag	88	129
Fagen er bundet til siden av bakterien	59	65
Fagen er bundet til tuppen av bakterien	19	22
Fagen er bundet til siden av pili	5	16
Fag og pili er bundet tupp mot tupp	2	8
Pili er bundet med tuppen til siden av fagen	3	18

Oslo, 26. september 2012



Hanh Hieu T. Phan